

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

Factores inmunológicos implicados en un control eficaz y espontáneo de la infección por VIH-1

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandra Peris Pertusa

Directores

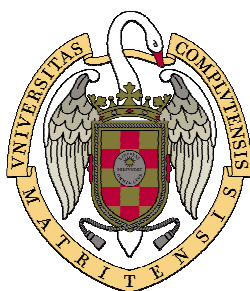
María de la O López Vázquez de la Torre
José Miguel Benito Huete

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**FACTORES INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS
EN UN CONTROL EFICAZ Y ESPONTÁNEO
DE LA INFECCIÓN POR VIH-1**

Tesis doctoral

Alejandra Peris Pertusa

Madrid 2011

TESIS DOCTORAL

FACTORES INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS EN UN CONTROL EFICAZ Y ESPONTÁNEO DE LA INFECCIÓN POR VIH-1

Esta memoria ha sido presentada para optar al Grado de Doctora en Ciencias Biomédicas por la Universidad Complutense de Madrid por:

Alejandra Peris Pertusa

Directores de la Tesis:

Dra. María de la O López Vázquez de la Torre

Doctora en Inmunología. Investigadora del área de Inmunología del laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III de Madrid.

Dr. José Miguel Benito Huete

Doctor en Medicina. Responsable del área de Inmunología del laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III de Madrid.

VºBº de los directores de la Tesis

A mis padres

A Matthias

A Mariola

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
1. Estructura del VIH-1	7
2. Ciclo replicativo del VIH-1.....	9
3. Curso natural de la infección por VIH-1	12
4. Activación inmunológica crónica como mecanismo patogénico fundamental en la infección por VIH-1	14
5. Establecimiento de reservorios virales.....	18
6. Pacientes no progresores a largo plazo y controladores de élite	19
7. Respuesta inmune frente al VIH-1	20
7.1. El papel de la inmunidad innata frente al VIH-1	20
7.2. El papel de la inmunidad humoral frente al VIH-1	22
7.3. El papel de la inmunidad celular frente al VIH-1	23
7.3.1. <i>El papel de las células T CD4+ frente al VIH-1</i>	<i>24</i>
7.3.2. <i>El papel de las células T CD8+ frente al VIH-1</i>	<i>25</i>
7.3.2.1. <i>Mecanismos de respuesta T CD8+ específica del VIH-1.....</i>	<i>26</i>
7.3.2.1.1. <i>Respuesta antiviral citotóxica</i>	<i>27</i>
7.3.2.1.2. <i>Respuesta antiviral no citotóxica</i>	<i>29</i>
7.3.2.2. <i>Alteraciones en la respuesta de las células T CD8+.....</i>	<i>30</i>
8. Factores implicados en el control espontáneo de la replicación viral	36
8.1. El sistema HLA y la respuesta inmune frente al VIH-1	38
8.2. Respuesta de células T CD8+ capaz de controlar la replicación viral	39
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	41
OBJETIVOS.....	43

PACIENTES Y MÉTODOS 45

1. Características de los sujetos de estudio.....	46
2. Recuento de linfocitos T CD4+	47
3. Cuantificación de la viremia plasmática	48
4. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)	49
5. Péptidos óptimos del VIH-1	49
6. Respuesta de las células T CD8+ específicas del VIH-1	50
7. Capacidad de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1	54
8. Análisis estadístico	55

RESULTADOS 56

1. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en pacientes con diferente progresión de la infección por VIH-1 durante 4 años.....	57
1.1. Población de estudio	57
1.2. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en progresores típicos	58
1.3. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en controladores virémicos.....	63
1.4. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en controladores de élite	66
1.5. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en progresores tratados con supresión de la viremia.....	70
2. Efecto del TARV sobre la calidad de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1.....	73
2.1. Población de estudio	73
2.2. La prevalencia de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1 no cambió significativamente al suprimir la viremia con TARV	74
2.3. La supresión de la viremia plasmática en pacientes bajo TARV modificó el perfil cuantitativo pero no modificó el perfil cualitativo de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1 ni a corto ni a largo plazo	76
2.4. Comparación del perfil funcional de las respuestas de células T CD8+ según su especificidad a lo largo del seguimiento	78
2.5. La prevalencia de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1 no cambió al suprimir la viremia con TARV	81
2.6. El nivel de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1 no se modificó después de 1 año de TARV.....	82

3. Estudio del efecto de la interrupción del TARV sobre la respuesta y la capacidad de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1	85
3.1. Población de estudio	85
3.2. La prevalencia de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1 no cambió en pacientes que interrumpieron el TARV	86
3.3. El incremento de viremia tras la interrupción del TARV modificó el perfil cuantitativo pero no modificó el perfil cualitativo de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1.....	87
3.4. La prevalencia de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1 no cambió en pacientes que interrumpieron el TARV	91
3.5. El nivel de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1 no cambió en los pacientes que interrumpieron el TARV.....	92

DISCUSIÓN	95
------------------------	-----------

CONCLUSIONES	108
---------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	110
---------------------------	------------

PUBLICACIONES SURGIDAS.....	137
------------------------------------	------------

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer a:

A los doctores *D. Juan González-Lahoz* y *D. Vicente Soriano* por haberme dado la posibilidad de pertenecer a su equipo y realizar esta tesis.

A mi director de tesis, Dr. D. José Miguel Benito, por darme la oportunidad de trabajar en su equipo y por brindarme su confianza, paciencia y apoyo.

A mi directora de tesis, Dra. Dña. Mariola López, por su confianza, apoyo, comprensión y gran paciencia. Gracias por esta tesis. Siempre supiste levantarme el ánimo y darme buenos consejos como a una amiga. ¡Mil gracias!

Al Dr. D. José Miguel Sempere Ortells por creer mí, por ser mi amigo y ser un gran *boss*.

A los técnicos de laboratorio por toda su ayuda prestada, por sus consejos, amistad y comprensión. Cada una de ellas siempre formará parte de mis recuerdos en el laboratorio. Ellas son Angélica Corral, Ainhoa Simón, Mariana Lapaz, Patricia Parra, Lorena Cuenca, Gema González-Pardo, Beatriz Sanz, Mar González, Antonio Rubio, Mar Molinero, Celia Ballesteros, Valle Rex, Cristina Ortega y Alma González (eres una más). Mi especial agradecimiento a Natalia Zahonero, que no es sólo una de los mejores técnicos de laboratorio que conozco, sino también una maravillosa amiga.

A mis compañeros “pre-doc” y “post-doc” de laboratorio, por haber compartido tantos momentos conmigo como la época pre-CROI, seminarios, clases de máster, congresos, cursos, comidas y risas. Os doy las gracias por haberme acompañado durante esta travesía. Gracias a Marcelle Bottecchia, Miguel Arredondo, Carolina Garrido, Elena Álvarez, Judit Morello, Zulema Plaza, Eduardo Seclén, Antonio Madejón, Tamara Bar-magen, Esther Torrecilla, David Vicent, Carlos Sánchez, Lourdes Anta, Ana Treviño,

Mateo Córdoba, Clara Restrepo, María Salgado, Eva Poveda, Carmen de Mendoza, Eva Ramírez, Carlos Toro, Arancha Amor y Sonia Rodríguez-Nóvoa. Muy especialmente doy las gracias a Berta Rodés, de la que he aprendido mucho a nivel personal y profesional.

A todos los clínicos del Servicio de Enfermedades Infecciosas y del Servicio de Enfermedades Tropicales del Hospital Carlos III, especialmente a Pablo Labarga, Pablo Rivas, José Medrano, Lola Herrero, Eugenia Vispo y Luz Martín-Carbonero.

A todas aquellas personas que donaron sangre a favor de la ciencia.

A los chicos del Servicio de Informática del Hospital Carlos III por “rescatarme” varias veces. Gracias a Eduardo Heras de los Rios, David Campos y Pablo Villaseñor.

A la secretaria de la F.I.B., Desirée Hernández, por su gran ayuda y amistad. Al personal de la Biblioteca del Hospital Carlos III, Josefina e Inmaculada Romero, por su rapidez y atención en conseguirme los últimos artículos.

A mis amigas por estar siempre ahí, aunque no estemos a veces ni en la misma ciudad, en especial a Beatriz T., Gloria, Paula, Silvia, Beatriz R. y Yasmina. Mil gracias a Maite Pascual por las risas en clases de flamenco y a Gema por los momentos tan buenos tanto en Alicante como en Madrid.

A mi familia por ser mis “fans incondicionales”, en especial a mi hermano Javier, a mis padrinos M^a Trini y Pepe, a mis tíos M^a Victoria y Carlos y a mis primos Carlos, Ana y Natalia.

A mis padres por quererme tanto y no “desheredarme” a pesar de todo. Sin ellos no lo hubiera conseguido. Gracias por TODO. Sois los mejores.

A Matthias por escucharme, apoyarme y darme toda su confianza y amor. Eres mi punto de equilibrio. Te dedico esta tesis.

RESUMEN

La respuesta de las células T CD8+ juega un papel fundamental en el control de la infección por VIH-1. Tras el fracaso de la vacuna frente al VIH-1 basada en la inducción de una respuesta de células T CD8+ antígeno-específica, se ha vuelto a replantear los conocimientos a nivel básico sobre las características determinantes de una respuesta inmune eficaz. Aquellos pacientes VIH-1+ que controlan espontáneamente la infección por VIH-1 ofrecen una oportunidad única para intentar conocer cuáles son los mecanismos implicados en dicho control. Entre estos mecanismos, parece ser importante la calidad de la respuesta de las células T CD8+ específicas del VIH-1. Asumiendo una interrelación entre la calidad de la respuesta de células T CD8+ y la replicación viral, se propuso analizar si existe una evolución temporal de la respuesta de células T CD8+ que producen MIP1 β , TNF α y/o IL2 en presencia de péptidos óptimos de Gag y de Nef en un total de 36 pacientes VIH-1 que experimentan una progresión divergente de la infección VIH-1.

Nuestros resultados mostraron una evolución diferente de dicha respuesta al cabo de 4 años de seguimiento en cada grupo de pacientes VIH-1. En aquellos pacientes VIH-1+ con una viremia alta persistente disminuyó la polifuncionalidad de las células T CD8+, mientras que en aquellos con viremia baja persistente y en aquellos con viremia indetectable inducida por el tratamiento antirretroviral o TARV se mantuvo una respuesta monofuncional. Interesantemente, la polifuncionalidad de las células T CD8+ aumentó en aquellos pacientes VIH-1+ con viremia indetectable controlada espontáneamente (controladores de élite). Todo ello sugiere que un alto nivel de funcionalidad de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1 podría ser la causa del control de la replicación viral.

Para estudiar si la supresión virológica con TARV influye en la relación causa-efecto entre la calidad de la respuesta de células T CD8+ y la replicación viral, se analizó la evolución de dicha respuesta en pacientes VIH-1 crónicos antes y después de iniciar TARV a corto y a largo plazo. También se propuso otro modo de analizar dicha relación causa-efecto y fue analizar el efecto de la interrupción del TARV en pacientes VIH-1+ que mantenían una supresión prolongada de la replicación viral. Nuestros resultados mostraron que no hubo una restauración del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 similar al de los controladores de élite, lo que sugiere que las posibles alteraciones en la respuesta de las células T CD8+ de los progresores típicos no son reversibles con el TARV a largo plazo durante la fase crónica de la infección por VIH-1.

INTRODUCCIÓN

1. Estructura del VIH-1

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1 (VIH-1) es un virus ARN que pertenece a la familia *Retroviridae*, del género *Lentivirus*. La partícula viral tiene forma esférica icosaédrica y mide 120 nm de diámetro (Figura 1). Está rodeada por una membrana lipídica que deriva de la célula hospedadora, por lo que contiene proteínas celulares, como HLA clase I y II y proteínas de adhesión como ICAM-1. Además, se integran 72 complejos de glicoproteína (gp) viral formados por trímeros de gp120 y gp41, esenciales para la interacción con la célula diana. La matriz está formada por la proteína p17 que está insertada en la superficie interna de la membrana lipídica. La cápside está formada por la proteína p24 y en su interior se encuentran el genoma viral (1) y todas las enzimas necesarias para su replicación (la transcriptasa inversa (TI), la integrasa (IN), la proteasa (PR) y las proteínas reguladoras y accesorias) (2). El genoma viral está formado por dos copias idénticas de 9,8 Kb de ARN monocatenario (ARNmc) con polaridad positiva y está estabilizado por la nucleoproteína p7.

El esquema del genoma retroviral es 5'LTR-gag-pol-env-LTR3' (Figura 1). Las dos repeticiones terminales largas o LTR (del inglés *Long Terminal Repeats*) en cada extremo son promotores transcripcionales y están relacionados con la integración del genoma viral en el ADN celular. El gen *gag* codifica para proteínas estructurales internas (p17, p24 y p7), el gen *env* codifica para las glicoproteínas de la envoltura viral (gp120 y gp41) y el gen *pol* codifica para la PR (p11), la TI (p66/p51), la ribonucleasa H y la IN (p32). Además, el VIH-1 contiene 6 genes más que codifican proteínas que controlan la expresión vírica y la infectividad: los genes *tat* y *rev* que

codifican para dos proteínas reguladoras (Tat y Rev) y los genes *vpu*, *vpr*, *vif* y *nef* que codifican para proteínas accesorias (Vpu, Vpr, Vif y Nef).

Las cepas del VIH-1 se clasifican según el grado de homología genética de sus secuencias en tres grandes grupos: M (*Main* o principal), O (*Outlier* o externo) y N (no-M, no-O). Actualmente, se ha descrito un nuevo grupo llamado grupo P (3). La mayoría de las cepas del VIH-1 pertenecen al grupo M, ya que es responsable del 97% de las infecciones a nivel mundial. Se distinguen dentro de él hasta 9 subtipos (denominados A-D, F-H, J, K) y más de 30 formas recombinantes circulantes (CRF). Aunque la mayoría de las infecciones en el mundo son debidas al subtipo no-B, es el subtipo B el que predomina en Europa y Norteamérica (4).

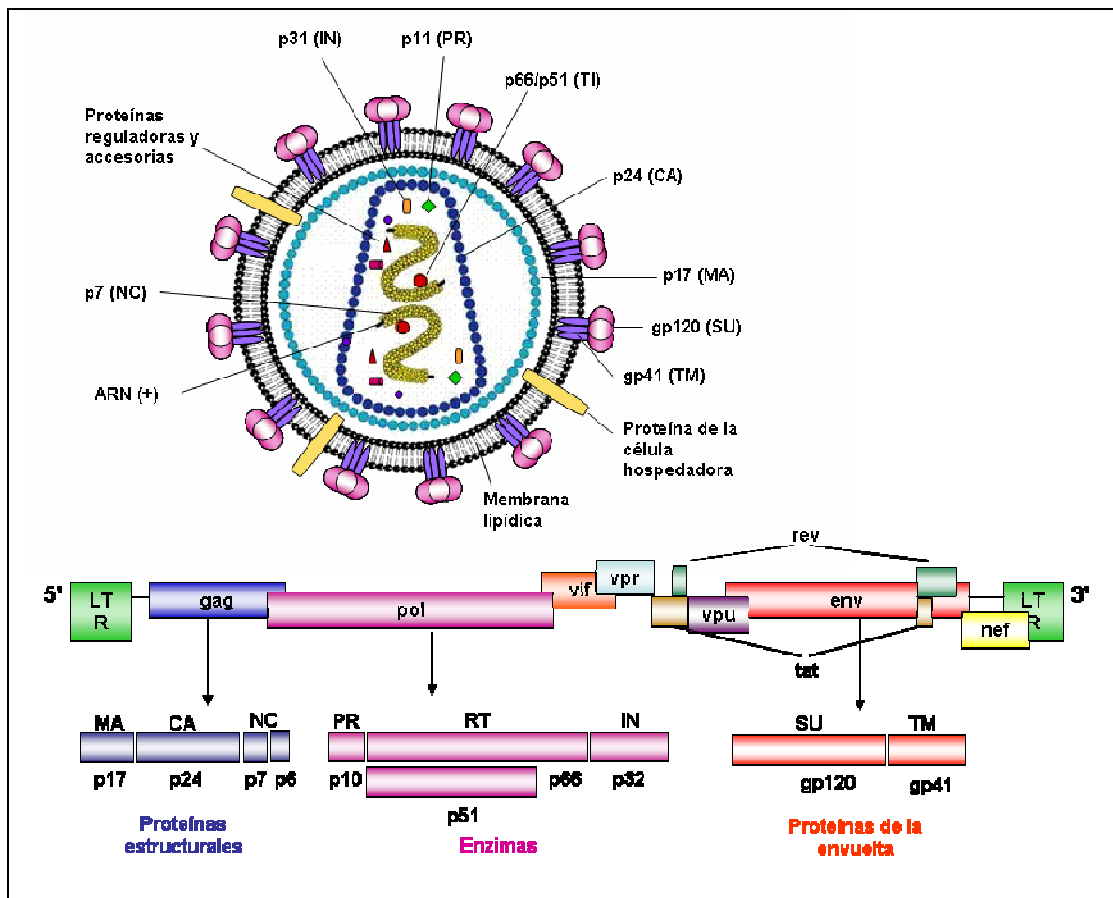


Figura 1. Estructura del VIH-1: morfología y organización del genoma.

2. Ciclo replicativo del VIH-1

El ciclo replicativo del VIH-1 (1,5), representado en la [Figura 2](#), puede dividirse en dos grandes fases (fase temprana y fase tardía) que a su vez pueden ser divididas en otras etapas.

Fase temprana o preintegración: comprende desde que el virus interacciona con la célula diana hasta la integración del genoma viral en el genoma celular.

➤ ***Etapas 1:*** *Interacción entre el virus y su célula diana.* La glicoproteína gp120 del virus se une específicamente al receptor celular CD4 (6), induciendo un cambio conformacional que le permite interaccionar con un correceptor de la familia de receptores de quimiocinas (CCR5 o CXCR4) (7,8). Estas interacciones inducen la fusión de la membrana lipídica del virión con la membrana celular. Posteriormente, se libera la nucleocápside viral al interior del citoplasma celular (9).

➤ ***Etapas 2:*** *Desencapsidación y retrotranscripción del genoma del virus de ARNm a ADN bicatenario (ADNbc).* Inmediatamente después de su liberación al citoplasma, se produce la desencapsidación y la retrotranscripción mediada por la TI (10), que convierte el ARNm del virus en ADNbc (11). Esta enzima tiene una elevada tasa de error (10^{-4}) (12,13) al no tener actividad 3'-5' exonucleasa correctora de errores, generando así una población viral heterogénea dentro del mismo individuo. El ADNbc del virus, una vez sintetizado, se acopla a factores virales (PR, TI, IN, MA y Vpr) y celulares (14) formando el complejo de preintegración.

- **Etapa 3:** Integración en el genoma del hospedador como ADN proviral. El complejo de preintegración se transporta hasta el núcleo celular, donde la IN viral es capaz de unir covalentemente el ADN viral al celular (15). El ADN proviral integrado puede permanecer latente o replicarse masivamente para producir nuevos viriones maduros con el consiguiente efecto citopático sobre la célula hospedadora.

Fase tardía o postintegración: comprende desde la expresión de los genes virales hasta la liberación y maduración del virión.

- **Etapa 4:** Síntesis de ARN viral. Cuando la célula CD4+ infectada se activa, comienza la transcripción del ADN proviral por la ARN polimerasa II celular (16), sintetizando ARN mensajero (ARNm) y ARN genómico. La proteína Tat aumenta la tasa de transcripción del genoma del VIH-1 y, junto con factores celulares, permite la elongación completa del ARNm. Después, la proteína Rev interviene en el procesamiento y el transporte del ARNm al citoplasma. Además, la proteína Vif es fundamental para bloquear los mecanismos celulares, como APOBEC3G (17-19) que degradaría el ARN viral (20,21).
- **Etapa 5:** Traducción del ARN viral. Cuando el ARNm es traducido en el citoplasma, necesita ser procesado por proteasas celulares y por la PR viral antes de ensamblarse y poder formar una nueva partícula viral. A partir del ARN genómico se traducirán los precursores de Gag y Gag-Pol, que posteriormente serán modificados por la PR viral (22,23).
- **Etapa 6:** Ensamblaje y salida de la célula. Las proteínas virales y el ARN genómico son transportados a la membrana celular por Rev (24) para el

ensamblaje. Factores celulares y la propia membrana citoplasmática intervienen en el proceso de salida del virión inmaduro (25,26).

- **Etapa 7: Maduración del virión.** Los viriones inmaduros son liberados de la célula hospedadora. Para completar la maduración se necesita que el precursor Gag sea procesado por la PR viral para generar las proteínas estructurales de la nucleocápside, la cápside y la matriz (27). De esta forma, la partícula viral madura puede infectar una nueva célula susceptible y, por tanto, continuar con la replicación viral.

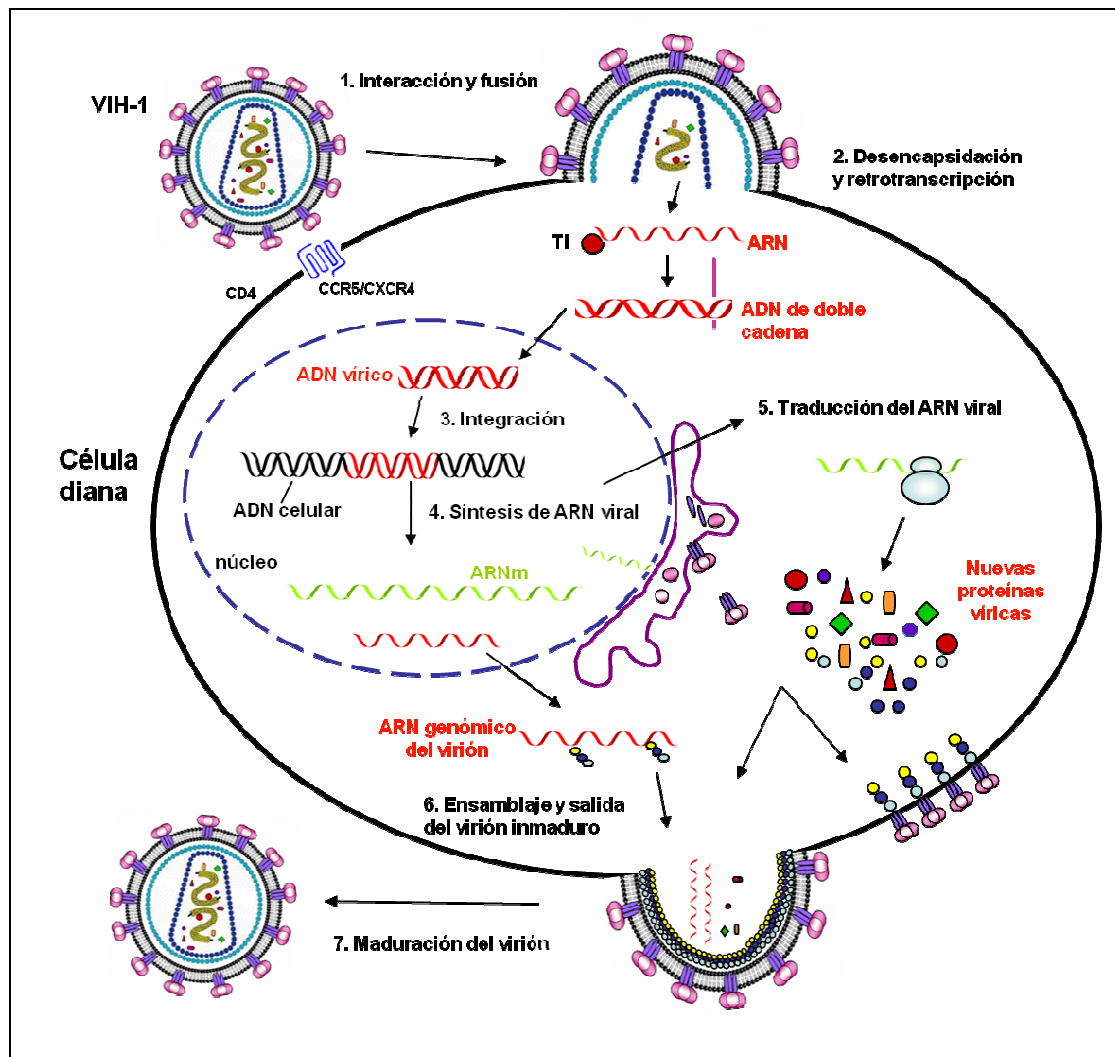


Figura 2. Ciclo biológico del VIH-1. ARNm, ARN mensajero; ARNm_c, ARN monocatenario; ADN_{bc}, ADN bicatenario; TI, transcriptasa inversa.

3. Curso natural de la infección por VIH-1

El CD4 es una glicoproteína monomérica que funciona como receptor principal para la entrada del VIH-1 en la célula diana. Se detecta en la superficie celular de los precursores de células T dentro de la médula ósea y timo, en el 60% de los linfocitos T, en monocitos y macrófagos, eosinófilos, células dendríticas y células de la microglía del sistema nervioso central. Así pues, la diana principal del VIH-1 es el sistema inmunológico, particularmente los linfocitos T CD4+ (28). Desde 1983, se sabe que el VIH-1 es el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida o SIDA en humanos (29,30).

Tras la entrada del VIH-1 al organismo, se inicia una infección en la que se pueden diferenciar tres fases que resultan de la interacción virus-hospedador: *aguda*, *crónica* y *SIDA*, que son representadas en la [Figura 3](#).

La **fase aguda** (o *primoinfección*) se caracteriza por los altos niveles de viremia plasmática, que alcanza su pico más alto a las 2 semanas (31), y por un descenso considerable en la cifra de células T CD4+ (32). Además, en el paciente VIH-1+ se observa un cuadro clínico inespecífico parecido al gripal (33). La disminución del pico de carga viral está asociada temporalmente con la aparición de la respuesta de células T CD8+ citotóxicas (CTL) específicas del VIH-1(34-36), la cual parece ser capaz de controlar parcialmente la replicación viral (34,35,37-39). La formación de anticuerpos específicos del VIH-1 generalmente se detecta entre la semana 3 y la 12, marcando el final de la seroconversión (40), aunque su presencia no se ha asociado con protección frente a la infección por VIH-1.

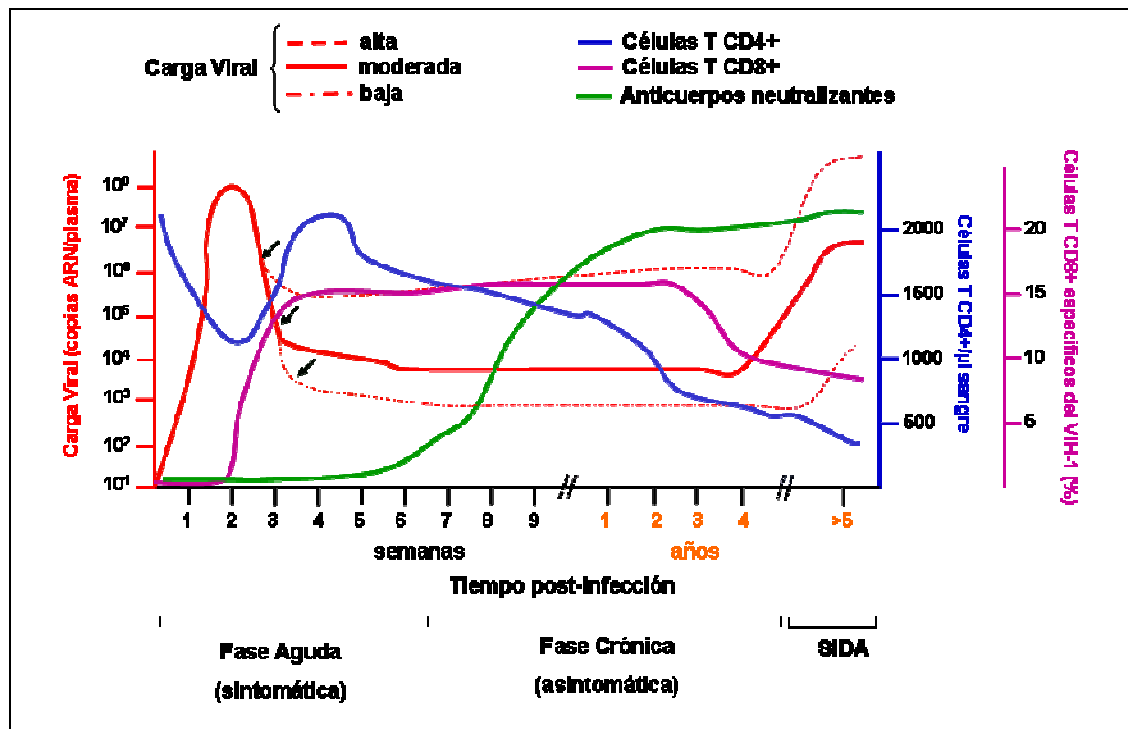


Figura 3. Evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos en la infección por VIH-1. Las flechas indican el establecimiento del *set point* viral, que puede ser alto, moderado o bajo, y persistirá durante la infección crónica. En el caso de algunos sujetos VIH-1+, la fase crónica puede durar hasta 15 años o más y en otros la fase de SIDA puede aparecer a partir de los 2 ó 3 años desde el inicio de la infección. CV, carga viral.

Después de unos pocos meses, la cifra de CD4+ se recupera hasta valores dentro del rango normal (en adultos varía entre 435-1600 células/μl), pero nunca valores tan altos como antes de la infección. Tras la fase aguda, la viremia plasmática disminuye hasta alcanzar un nivel estable (*set point*), el cual persistirá hasta fases muy avanzadas de la infección. Este *set point*, resultado de la interacción entre los factores virales e inmunológicos del individuo infectado, determina la velocidad de progresión de la enfermedad (41-46). Cuanto mayor sea el *set point* viral, más rápida será la disminución en el nivel de las células T CD4+.

Durante toda la **fase crónica** (de entre 8 a 10 años), existe una eliminación persistente de los linfocitos T CD4+, debido fundamentalmente a

la apoptosis inducida por mecanismos relacionados con la hiperactivación del sistema inmunológico (47). La recuperación homeostática de células T CD4+ es insuficiente para compensar esta pérdida, lo que resulta en una disminución paulatina del nivel de células T CD4+ en sangre periférica y en órganos linfoides. Además, la aparición de variantes virales de escape, más virulentas a medida que progresa la infección, acelera la destrucción del sistema inmunológico.

Finalmente, el estadio más avanzado de la infección se caracteriza por un incremento persistente del nivel de viremia y por una profunda inmunosupresión reflejada en un nivel de células T CD4+ <200 células/μl en sangre, lo que conlleva a la aparición de enfermedades oportunistas y neoplasias que definen el **SIDA** (48,49).

4. Activación inmunológica crónica como mecanismo patogénico fundamental en la infección por VIH-1

La activación inmunológica crónica ha sido correlacionada con la progresión a SIDA en sujetos infectados por VIH-1, independientemente de cual fuese la cifra de células T CD4+ (50). Esta activación crónica de las células T es el mayor determinante de la eliminación de las células T CD4+ (51-55), debido a que un mayor nivel de activación se ha asociado con una mayor susceptibilidad a la apoptosis (56).

La principal causa de activación de las células T es la estimulación con antígenos, tanto específicos como no específicos, que refleja un aumento de la inmunidad antiviral. Durante la infección por VIH-1, se han

descrito mecanismos directos e indirectos relacionados con la replicación viral ([Figura 4](#)) que contribuyen al estado de hiperactivación persistente. Varios estudios *in vitro* muestran que proteínas virales como Nef (57-59) y gp120 (60,61) inducen la activación de forma directa de linfocitos y macrófagos que contribuyen al estado proinflamatorio. Otros virus latentes, como citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein-Barr (VEB), pueden reactivarse durante la activación inmune inducida por el VIH-1 (62). La mayor destrucción de células T CD4+ durante la infección por VIH-1 se produce en el tejido linfático de la mucosa del intestino (GALT) (63-65), posiblemente debido a que la mayoría de las células T CD4+ que residen en este tejido presentan el fenotipo ideal para la replicación del VIH-1 (63,66). Esta replicación preferente en el GALT puede comprometer la integridad y permeabilidad de la barrera intestinal (67,68), lo que resulta en la translocación de productos microbianos desde el lumen intestinal a la circulación sanguínea implicados en la hiperactivación del sistema inmune (69).

La activación inmune crónica conlleva a la alteración de la homeostasis del sistema inmune (52,53,70-73), a un envejecimiento prematuro del sistema inmune y al desarrollo de inmunodeficiencia (74). En paralelo, se establece un estado proinflamatorio (75) que produce el deterioro de algunas funciones fisiológicas. El resultado final de todos estos procesos es el colapso de la capacidad del sistema inmune para controlar a otros patógenos, lo que finalmente conduce a la aparición de SIDA.

Cuando un individuo infectado inicia tratamiento antirretroviral (TARV), el grado de activación de las células T disminuye, sugiriendo que

los niveles de replicación son los que contribuyen directamente a aumentar el grado de activación en estas células (73,76-80). Igualmente, en estos individuos tratados, la evolución de la activación de las células T CD8+ está relacionada con el aumento de la cifra de células T CD4+ (81), lo que explica que un mismo nivel de replicación viral pueda inducir distintos niveles de activación y, por tanto, progresen de modo diferente. Sin embargo, la recuperación inmune en estos individuos no se restablece totalmente (79), incluso cuando hay supresión de la viremia plasmática, lo que sugiere que las anormalidades pueden persistir y contribuir a la disfunción inmune residual.

En el modelo SIV en primates, la activación resulta ser un factor crítico que diferencia la infección patogénica (en macacos *Rhesus*) de la no patogénica (*sooty mangabeys* y monos verdes africanos, hospedadores naturales). Por tanto, estas observaciones apoyan la hipótesis de que el VIH-1 causa progresión de la enfermedad como consecuencia de la activación generalizada de células T (82), acompañada por un agotamiento del sistema inmune para regenerar células T (83) y un ambiente inflamatorio (75), lo que resulta en una continua pérdida gradual de células T CD4+ (52,53,72,73). Es, por tanto, fundamental entender los mecanismos de activación inmune y buscar estrategias terapéuticas para revertir dicha activación.

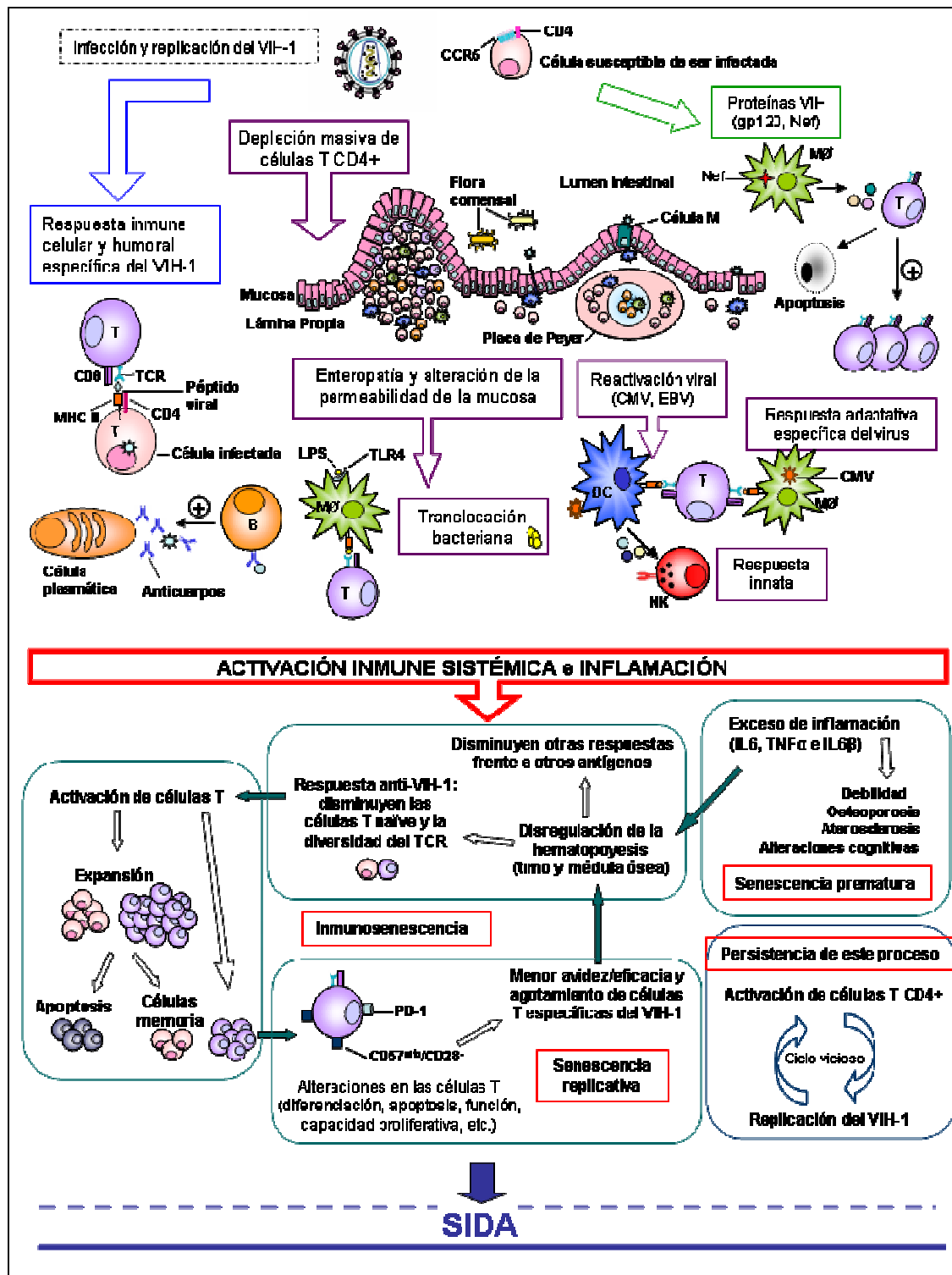


Figura 4. Esquema de las principales causas de la inmunopatogénesis del VIH-1. T, linfocito T; B, linfocito B; DC, célula dendrítica; MØ, Macrófago; NK, células asesinas; TCR, receptor de células T; BCR, receptor de células B; TLR-4, "Toll-like Receptor-4" o receptor de tipo Toll 4; LPS, lipopolisacárido; PD-1, "Programmed Death 1" o molécula de muerte programada 1; IL-2, interleuquina 2.

5. Establecimiento de reservorios virales

Uno de los factores que podría contribuir en el mantenimiento de la hiperactivación inmune en pacientes infectados por VIH-1 es la existencia de una replicación residual derivada de las células que actúan como reservorios virales.

En el ciclo replicativo del VIH-1, se pueden diferenciar dos tipos de latencia viral. La primera es la *latencia pre-integración* (generación de diferentes formas de ADN viral antes de la integración) que predomina en las células T CD4+ naïve de individuos infectados no tratados (84-86). Se trata de una forma lábil de latencia que decae rápidamente cuando el sujeto es tratado con antirretrovirales (84,86). La segunda es la *latencia post-integración* (falta de replicación después de la integración del ADN viral en el genoma celular) (87) que predomina en las células T CD4+ memoria, garantizándose así la persistencia del virus a largo plazo. Este tipo de latencia parece establecerse durante la infección primaria (88).

Otras células han sido propuestas como posibles reservorios virales, como los monocitos/macrófagos (44,89) y las células dendríticas de los nódulos linfáticos (90,91). Aparte de las células que expresan CD4+ en su superficie, varios estudios *in vitro* (92-94) e *in vivo* (95-97) han observado células T CD8+ infectadas por el VIH-1.

Hasta la fecha, los reservorios virales representan una barrera fundamental para la erradicación del virus y para el desarrollo de una respuesta inmune antiviral eficaz (98). Actualmente, se están desarrollando nuevas terapias dirigidas a la erradicación de estos reservorios virales (99).

6. Pacientes no progresores a largo plazo y controladores de élite

En base al curso evolutivo de la infección por VIH-1, se puede clasificar a los individuos infectados en tres grupos: 1. *Progresores Típicos* (90% de los infectados), con un periodo de desarrollo de SIDA de entre 7-10 años; 2. *Progresores Rápidos* (5%), que desarrollan SIDA antes de 5 años; 3. *No Progresores a Largo Plazo* o LTNP (del inglés, *long-term non-progressors*) (5%), que permanecen clínicamente asintomáticos e inmunológicamente estables (>500 células T CD4 $^{+}$ / μ l) durante más de 10 años de infección sin TARV (100-104). Sin embargo, hay varios trabajos que indican que la mayoría de estos pacientes LTNP desarrollan signos de progresión de la enfermedad, incluyendo un aumento de la carga viral y una disminución de las células T CD4 $^{+}$ (105-110). No obstante, la progresión de la infección no ha sido observada en un grupo de pacientes que controlan espontáneamente la replicación viral, con niveles por debajo del límite de detección de los ensayos comerciales disponibles (<50 copias ARN-VIH-1/ml). Estos individuos, que representan menos del 0,5% de todos los infectados por VIH-1, han sido llamados *controladores de élite* (CE) (111-113). Aunque la característica principal de este grupo se basa en un concepto virológico, hay discrepancias en cuanto a si se tienen en cuenta o no la cifra de CD4 y el tiempo de infección.

Actualmente, se han establecido dos grandes cohortes, el Consorcio de Controladores VIH (114) y el grupo de estudio de Controladores VIH *ANRS EP36* (111,113,115). La primera cohorte define dos grupos de controladores según la carga viral: los CE, aquellos que presentan viremia

plasmática indetectable en el último año o antes en ausencia de TARV, y controladores virémicos, que mantienen carga viral detectable pero por debajo de 2000 copias/ml en el último año o antes en ausencia de TARV. La segunda cohorte define al CE como a un LTNP con carga viral indetectable. Estudiar a los LTNP y, en particular, los CE, puede ayudar a esclarecer qué mecanismos están implicados en el control de la replicación del virus y, de este modo, ayudar a diseñar estrategias más efectivas para luchar contra el VIH-1.

7. Respuesta inmune frente al VIH-1

7.1. El papel de la inmunidad innata frente al VIH-1

La primera línea de defensa contra las infecciones está mediada por la inmunidad innata, pero esta defensa se encuentra alterada en pacientes infectados por VIH-1 (116,117), lo que contribuye a la patogénesis del SIDA.

Una parte fundamental de esta inmunidad son las células NK (del inglés, *natural killer*), que desempeñan una función citotóxica antiviral (citotoxicidad natural directa o dependiente de anticuerpos) (118,119) y son productoras potentes de citoquinas y quimiocinas (120). En el curso de la infección, las células NK disminuyen cuantitativamente y presentan alteraciones funcionales, sobre todo en sujetos infectados con carga viral alta (121-123). Sin embargo, en LTNP, las células NK mantienen su fenotipo normal con una mayor capacidad citotóxica (124). Estos hallazgos sugieren que las células NK están implicadas en el control parcial de la infección por VIH-1 (125,126). Por otra parte, el efecto de la supresión de la replicación

viral tras el inicio del TARV restuara la función y la cantidad de las células NK (123,127-130).

Los monocitos/macrófagos también juegan un papel fundamental en la inmunidad innata antiviral, aunque en el curso de la infección por VIH-1 se han observado algunas anomalías funcionales (117,131,132).

Las células dendríticas son los inductores más potentes de las respuestas inmunes específicas. Son capaces de capturar y procesar antígenos en la periferia, para luego expresarlos en su membrana a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I ó II que inician la activación de la célula T CD8+ o CD4+, respectivamente. En la infección por VIH-1, las células dendríticas tienen un doble papel: interaccionar con los linfocitos T para iniciar la respuesta inmune específica y facilitar la infección por VIH-1 a través de los receptores de lectinas (133).

Tanto los macrófagos como las células dendríticas producen interferones de tipo I (IFN α e IFN β) que tienen funciones antivirales e inmunomoduladoras (134). El IFN α parece inhibir varios pasos del ciclo viral (135). Una alta producción de IFN α se ha observado en individuos LTNP (136), mientras que una baja capacidad de producción de este interferón ha sido asociada con una alta viremia plasmática y una rápida progresión (137). Además, en sujetos VIH-1+ en TARV, se ha observado una asociación entre la disminución de la carga viral y un aumento de las células dendríticas productoras de IFN α (138).

Las defensinas son péptidos endógenos naturales con actividad frente a bacterias, hongos y virus (139). En humanos, se han descrito 2 clases de defensinas, α y β , con actividad anti-VIH-1 (140-142). Las α -defensinas, que

son producidas principalmente por neutrófilos (143,144), parecen tener un doble mecanismo anti-VIH-1: 1) bloqueo de la entrada del VIH-1 al interferir en la unión del gp120 viral con el CD4 de la célula diana (145); y 2) bloqueo del ciclo replicativo del VIH-1 al inhibir el transporte del ADN viral al núcleo celular (146). Además de estas funciones, las α -defensinas tienen también una importante actividad inmunomoduladora (142,145,147). Recientemente, se ha sugerido un papel protector frente a la progresión de la enfermedad al observar que los CE presentan una mayor producción de α -defensinas 1-3 por las células dendríticas que los pacientes no controladores (148).

7.2. El papel de la inmunidad humoral frente al VIH-1

La respuesta inmune humoral está mediada fundamentalmente por las células B. Estas células secretan anticuerpos neutralizantes frente a proteínas virales, mediando, por tanto, en el control de la replicación viral (149,150). Estos anticuerpos con actividad neutralizante pueden contribuir al aclaramiento viral durante las primeras semanas de la infección (151,152), pero tanto la cantidad como su especificidad aumenta durante la fase crónica (151,153). Sin embargo, la respuesta inmune humoral parece jugar un papel minoritario en el control de la infección por VIH-1, dado que la eliminación de células B con anticuerpos monoclonales (AcMo) en simios con infección crónica por SIV+ no afecta al curso de la viremia plasmática (154). Además, los sueros obtenidos de pacientes VIH-1+ no son capaces de reducir significativamente la infectividad viral *in vitro* (155). Por otra parte, no se encuentra una correlación entre la cantidad de anticuerpos neutralizantes específicos del VIH-1 en mujeres embarazadas infectadas y la

tasa de transmisión vertical (156). En individuos expuestos no infectados se ha observado una falta de respuesta de anticuerpos detectable frente al VIH-1. Hay evidencias de que, en todos los estadios de la infección por VIH-1, los anticuerpos neutralizantes preferentemente reconocen e inhiben las cepas virales anteriores pero no las actuales, lo que significa que el VIH-1 rápidamente escapa de la presión ejercida por los anticuerpos (151,157,158). No obstante, se ha sugerido que altos títulos de anticuerpos neutralizantes pueden prevenir la superinfección (159).

En pacientes LTNP se han observado títulos altos de anticuerpos anti-p24 (160) y con persistencia de anticuerpos neutralizantes frente a virus primarios autólogos y heterólogos (103). Sin embargo, no está claro si la presencia de anticuerpos neutralizantes en LTNP representa una parte de la protección o si refleja simplemente un sistema inmune menos dañado (153,157,158,161).

7.3. El papel de la inmunidad celular frente al VIH-1

La respuesta inmune celular mediada por los linfocitos T CD4+ y CD8+ es fundamental en el control de la replicación en las infecciones virales (162,163). Existen numerosas evidencias tanto en modelos animales como en humanos de la importancia que dichas células tienen sobre el control parcial de la replicación del VIH-1 (34,35,37,164-167). Sin embargo, los factores o características de la respuesta inmune celular determinantes de protección frente a este virus no se conocen bien.

7.3.1. El papel de las células T CD4+ frente al VIH-1

En la infección por VIH-1, se produce una pérdida progresiva tanto cuantitativa como funcional de las células T CD4+, especialmente de las células T CD4+ específicas del VIH-1 (168). Esta pérdida tiene lugar principalmente en los tejidos linfoides asociados a las mucosas, como en el GALT, que son donde residen la mayoría de las células T CD4+ (66,169,170). Estas células T CD4+ de la mucosa muestran las características que las hacen especialmente sensibles a la infección: tienen un fenotipo memoria, expresan el correceptor CCR5 y presentan un estado activado (63,66).

Las células T CD4+ efectoras pueden inhibir la replicación viral a través de la producción de citoquinas antivirales e, incluso, por citotoxicidad, pero también activan células dendríticas y proporcionan ayuda a las células B y T CD8+. Además, las células T CD4+ son necesarias para el mantenimiento de una respuesta efectiva a largo plazo de las células T CD8+ memoria VIH-1-específicas (171-173). Un estudio mostró que, durante la fase crónica de la infección, el mantenimiento de la respuesta T CD8+ no es posible si no se añade IL2 exógena o células T CD4+ aisladas durante la primoinfección (171). Esto parece indicar que el agotamiento de la respuesta T CD4+ durante la fase crónica de la infección explicaría parcialmente el defecto de la respuesta T CD8+. Algunos estudios han observado que en la mayoría de los pacientes infectados existen células T CD4+ VIH-1-específicas capaces de activarse y secretar IFN γ , aunque, sin embargo, tienen una baja capacidad proliferativa y una baja producción de IL2 (174,175). Además, parece que la frecuencia de células T CD4+ VIH-1-

específicas que secretan IL2 e IL2/IFN γ están asociadas inversamente con los niveles de viremia plasmática y, curiosamente, estas subpoblaciones no están representadas en los pacientes progresores (176). Sin embargo, los LTNP presentan células T CD4+ VIH-1-específicas capaces de producir simultáneamente IL2 e IFN γ (177). Durante el TARV, se observa una disminución progresiva de la respuesta T CD4+ anti-VIH-1 y no se observa una recuperación significativa después de un año de supresión viral efectiva bajo TARV (178).

7.3.2. El papel de las células T CD8+ frente al VIH-1

Varios hechos demuestran que la respuesta inmune de las células T CD8+ específicas del VIH-1 juega un papel fundamental en el control de esta infección: i) como ya se ha comentado anteriormente, la aparición de células T CD8+ citotóxicas específicas del VIH-1 en sangre periférica coincide con la disminución del pico de viremia durante la infección aguda (34-36). Además, en la fase crónica de la infección, hay una correlación inversa entre la carga viral y el número de linfocitos T CD8+ específicos de secuencias del VIH-1 (epítomos) inmunodominantes (36). ii) En un estudio en macacos infectados por SIV, la eliminación de células T CD8+ usando AcMo anti-CD8 conduce a un aumento de la carga viral, tanto en la infección aguda como en la crónica (163,179). iii) La eliminación de linfocitos T CD8+ de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) totales de individuos seronegativos resulta en un aumento significativo de la replicación del VIH-1 tras la infección del resto de células *in vitro* (180). iv) Las mutaciones de escape frecuentemente ocurren en los epítomos de las células T CD8+ (181-

183), sugiriendo que estos linfocitos ejercen una presión inmunológica en secuencias virales específicas. v) Los sujetos VIH-1+ que controlan espontáneamente la infección sin terapia antirretroviral presentan a menudo una respuesta T CD8+ específica del VIH-1 fuerte y polifuncional (184-187). vi) Los individuos expuestos no infectados muestran grandes cantidades de células T CD8+ específicas del VIH-1, aunque la causa principal en la prevención de la adquisición de la infección por VIH-1 no está probada (188,189). Sin embargo, los mecanismos por los cuales las células T CD8+ controlan, al menos parcialmente, la replicación del VIH-1 continúan siendo investigados.

7.3.2.1. Mecanismos de respuesta T CD8+ específica del VIH-1

Los linfocitos T CD8+ específicos del VIH-1 disponen de mecanismos para eliminar a las células CD4+ infectadas y, por tanto, inhibir la replicación viral, pero primero las células infectadas han de ser reconocidas ([Figura 5](#)). El mecanismo de presentación antigénica comienza con el procesamiento del antígeno en el citoplasma de la célula CD4+ infectada. La proteína viral sufre proteólisis por el proteasoma generando péptidos antigénicos (8-10 aminoácidos). Selectivamente estos péptidos serán transportados al retículo endoplasmático rugoso por las proteínas asociadas a la transcitosis (TAP) . Una vez allí, se unirán a moléculas de nueva síntesis de MHC-I, formándose los complejos MHC-péptido que serán expuestos en la membrana celular. De esta forma, el linfocito T CD8+ a través de su TCR y de la proteínas CD8 reconocerá el complejo MHC-péptido en la célula CD4+ infectada, desencadenándose una cascada de señales que acabará con la lisis de la

célula CD4+ infectada. Además de la respuesta citotóxica (190,191), restringida por el HLA específico de antígeno, los linfocitos T CD8+ también pueden ejercer una inhibición no citotóxica de la replicación viral mediante la liberación de factores solubles (192-194).

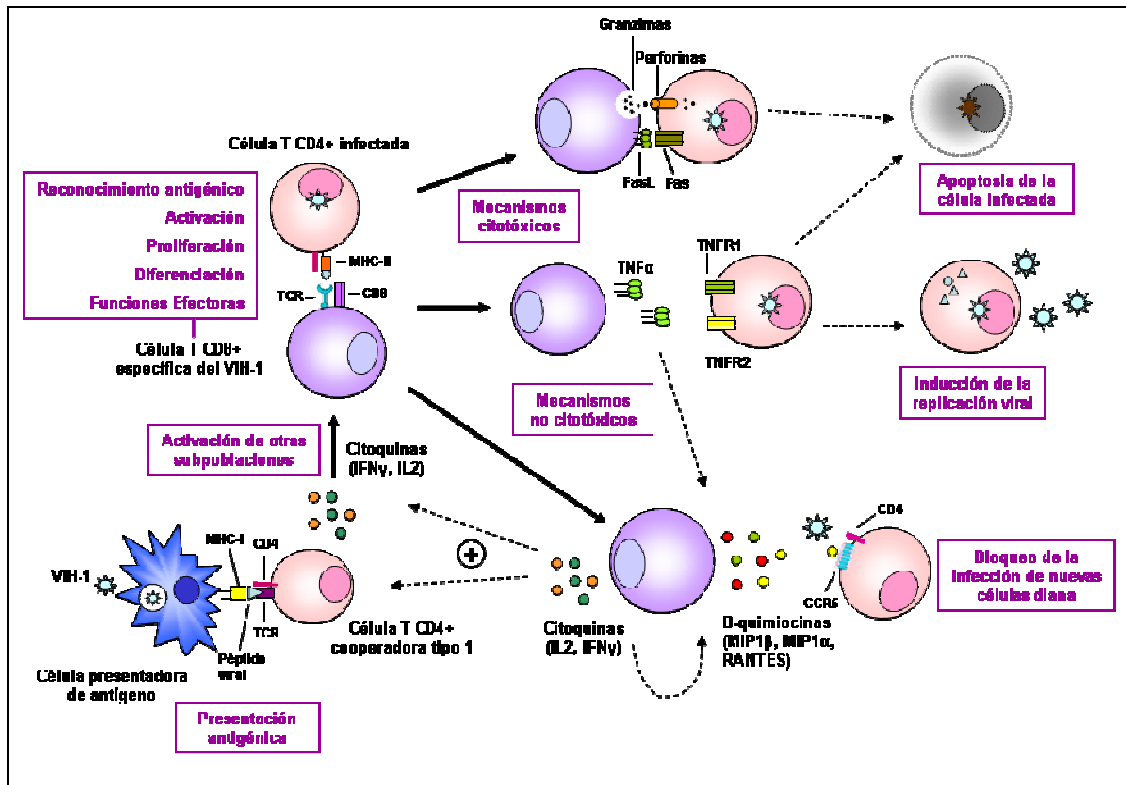


Figura 5. Respuesta inmune celular frente al VIH-1. La célula presentadora de antígeno procesa y presenta los péptidos virales a la célula T CD4+ cooperadora de tipo 1, cuyo papel es fundamental para el desarrollo de una buena respuesta de células T CD8+. Cuando la célula T CD8+ reconoce péptidos virales en la membrana de la célula infectada, efectúa sobre ella funciones citotóxicas. También libera β -quimiocinas que protegerán a otras células diana frente al VIH-1 y citoquinas que modularán la respuesta inmune desarrollada.

7.3.2.1.1. Respuesta antiviral citotóxica

Los principales mecanismos que inducen la apoptosis de la célula infectada mediados por los linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL) son: 1) la liberación del $\text{TNF}\alpha$, 2) la liberación de granzimas y perforinas (190) y 3) la interacción de Fas-FasL (191).

El TNF α parece ser la primera citoquina liberada dado que se ha observado la presencia de ARNm del TNF α preformado en las células T CD8+ específicas de LCMV (195). El TNF α se une al receptor TNFR1 que se encuentra en la superficie de las células CD4+, activando la cascada de las CASPASAS que induce la apoptosis de la célula CD4+ infectada. Además, algunos estudios sugieren que el TNF α puede inducir la expresión de factores protectores frente al VIH-1 como MIP1 α (del inglés, *Macrophage Inflammatory Protein*), MIP1 β y RANTES (del inglés, *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*) en distintas células (196,197).

Las granzimas y las perforinas son gránulos líticos que se encuentran preformados en el citoplasma del linfocito T CD8+ en forma de lisosomas, los cuales son liberados tras el reconocimiento de la infectada por el linfocito T CD8+ (198). La perforina liberada se polimeriza y forma un poro en la membrana de la célula diana (199), lo cual permite el paso de granzimas (serín-proteasas proapoptóticas) (200) y otras moléculas (granulisina). Las granzimas pueden inducir la apoptosis de la célula diana activando la cascada de las CASPASAS (201) y/o fragmentando el ADN por un mecanismo todavía desconocido (202,203).

La interacción del ligando de Fas (FasL o CD178) de la célula T CD8+ activada con Fas (CD95 o Apo-1) de la célula diana (204), induce la trimerización del dominio de muerte asociado a Fas (FADD) que activará la cascada de las CASPASAS y/o promoverá la liberación del citocromo c, conduciendo a la degradación del ADN y, por tanto, a la muerte de la célula diana (205,206).

7.3.2.1.2. Respuesta antiviral no citotóxica

En 1986 se propone un nuevo modelo de inmunidad antiviral mediada por las T CD8+ que implica la supresión de la replicación viral sin eliminar a la célula infectada y que podría potenciar los mecanismos celulares específicos anti-VIH-1 (166). Esta respuesta comprende el factor antiviral CAF, las quimiocinas y las citoquinas.

Se ha observado un factor antiviral CD8+ denominado CAF (*Cellular AntiHIV Factor*) (207,208), cuya naturaleza es diferente a las β -quimiocinas, citoquinas (193,209) y α -defensinas (141,210). CAF es producido por las células T CD8+ activadas sin requerir especificidad HLA, aunque si hay contacto célula-célula aumenta su efecto (207,211). Estudios recientes señalan que las células T CD8+ producen un precursor del CAF que necesita ser proteolizado para ser activo (141), no sólo en la superficie celular, sino también en el interior de la célula CD4+ (137). Tiene la capacidad de inhibir la replicación de cepas R5 y X4 del VIH-1 y de otros retrovirus, como VIH-2 y SIV (212,213), a través de la inhibición de la transcripción viral (214,215). Se ha observado su papel antiviral en individuos expuestos no infectados (216) y se ha relacionado con la no progresión de la enfermedad (217).

Entre los factores solubles implicados en la respuesta no citotóxica cabe destacar las β -quimiocinas (193), como MIP1 α (CCL3, del inglés, *chemokine (C-C motif) ligand 3*), MIP1 β (CCL4) y RANTES (CCL5). Su efecto antiviral se debe a que pueden inhibir la replicación de los virus que usan el correceptor CCR5 para la entrada, ya que estas β -quimiocinas son ligandos naturales de este receptor (193). Además, hay varios trabajos que

apoyan su papel protector en la infección por VIH-1 (218-220), aunque, estudios posteriores exclusivamente indican que la supresión del VIH-1 por las células T CD8+ no está limitada por la acción de las β -quimiocinas (193,209), sugiriendo la existencia de otros factores solubles implicados en dicha respuesta.

Otros mediadores solubles liberados por las células T CD8+ críticos para su papel en el control de la infección son la IL-2 y el IFN γ . La unión de la IL2 a su receptor induce la proliferación de las células T CD8+ a través de la vía Jak/STAT (221-223). El IFN γ activa genes regulados por IFN γ implicados en inducir proteínas celulares antivirales (224), promover la respuesta Th1 y aumentar la inmunidad citotóxica específica al facilitar el reconocimiento de la célula infectada por los linfocitos T CD8+ (225). En el contexto del VIH-1, se ha observado que un alto número de células T CD8+ específicas de VIH-1 productoras de IFN γ han sido asociadas con una baja viremia y una cifra de células T CD4+ mantenida (184,186).

7.3.2.2. Alteraciones en la respuesta de las células T CD8+

En la infección por VIH-1, la falta de respuesta antiviral no sólo se debe a la eliminación física de las células T CD8+, sino también a otros defectos cualitativos que alteran su funcionalidad.

Las células T CD8+ maduras que salen del timo, pero que aún no se han encontrado con el antígeno, son llamadas *naïve*. Estas células circulan por los órganos linfoides secundarios (bazo, nódulos linfáticos y placas de Peyer), vía sanguínea o linfática, para reconocer al antígeno unido a MHC-I de las células presentadoras de antígenos. Una vez que la célula T CD8+

naïve se encuentra con el antígeno, se activa, prolifera clonalmente y se diferencia en células T CD8+ memoria central, parte de las cuales maduran a memoria efectoras y efectoras totalmente diferenciadas, dirigiéndose a los tejidos inflamados para eliminar al patógeno y muriendo la gran mayoría por apoptosis. Las células T CD8+ memoria central pueden expandirse rápidamente adquiriendo funciones efectoras tras la re-estimulación antigénica (226). Además, su capacidad de para proliferar en ausencia de antígeno confieren al individuo inmunidad protectora a largo plazo tras una segunda infección (227).

La primera descripción de subpoblaciones de células T CD8+ en humanos se basaba en la expresión de los receptores de superficie CD27 y CD45RA, dividiéndose en *naïve* (CD27+CD45RA+), memoria central (CD27+CD45RA-), memoria efectora (CD27-CD45RA-) y efectoras totalmente diferenciadas (CD27-CD45RA+) (228). Más tarde se completaría esta clasificación con el uso de los marcadores CCR7 (229) y CD28 (230). Sin embargo, no existe un consenso entre el fenotipo y el patrón de producción de citoquinas que caracterice a las células T antígeno-específicas, posiblemente debido a las diferentes vías de estimulación y a los distintos mecanismos de evasión inmune utilizados por el virus.

Aunque existen diferentes teorías sobre las distintas vías de diferenciación de las células T (231), en humanos el modelo lineal de diferenciación progresiva es el más aceptado ([Figura 6](#)).

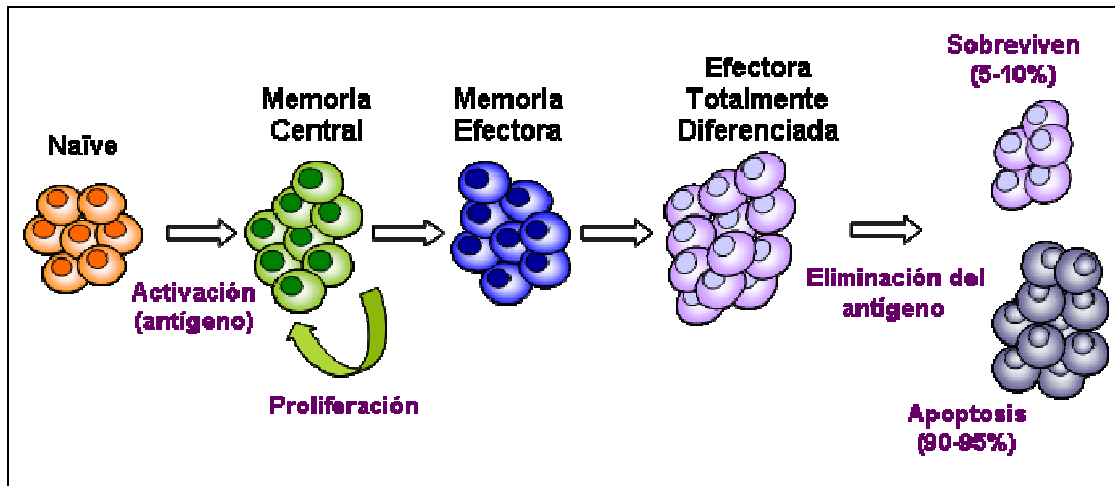


Figura 6. Representación esquemática del modelo lineal de diferenciación de las células T CD8+. Las células T CD8+ *naïve* en presencia de su antígeno se diferencia en células memoria central, las cuales maduran en células efectoras totalmente diferenciadas, pasando por un estadio intermedio (memoria efectora). Tras el aclaramiento del antígeno, sólo sobreviven unas pocas células efectoras totalmente diferenciadas.

En el caso de las células T CD8+ antígeno-específicas, se observa un perfil único de diferenciación dependiendo de su especificidad viral (230). En muchas infecciones crónicas, se ha observado que, además de los mecanismos virales para escapar del control de la respuesta inmunológica, las células T CD8+ virus-específicas fallan al diferenciarse en células T CD8+ memoria (232). Para infecciones resueltas, como el virus influenza, las células T CD8+ virus-específicas muestran predominantemente un fenotipo memoria central, mientras que para las infecciones crónicas no resueltas parece ser que no se desarrolla una respuesta de memoria correctamente debido a la continua presencia del antígeno (230). En pacientes VIH-1+, se observa un estadio intermedio de diferenciación entre memoria central y efectoras totalmente diferenciadas de las células T CD8+ específicas del virus (230). Todo esto sugiere que en el VIH-1 existe un bloqueo en la maduración hacia las células efectoras totalmente diferenciadas que eliminarían al virus. Además, la expresión persistente del CD27 en las

células T CD8+ VIH-1-específicas se ha asociado con la falta de producción de perforina, pero no de citoquinas ni quimiocinas (233), lo que contribuye a disminuir la supresión de la replicación del VIH-1 mediada por estas células.

Actualmente, la caracterización del fenotipo y función de las diferentes subpoblaciones de células T, las vías de diferenciación y su papel en la respuesta inmune se están investigando. Sin embargo, estos estudios son incapaces de definir un estadio de diferenciación que esté asociado con células T protectoras (234). Por consiguiente, la interpretación del fenotipo en relación con la eficacia de las células T permanece ambigua y, debido a la compleja relación entre fenotipo y función de células T, se necesitan más estudios detallados para la identificación de las células T efectoras.

En la infección por VIH-1, las células T CD8+ VIH-1-específicas sufren una regulación a la baja de la expresión de CD3 ζ , que viene acompañada por la pérdida del receptor coestimulador CD28, asociado con defectos en la estimulación del TCR (235,236). Este defecto ha sido relacionado con una estimulación antigénica crónica (236).

La expresión aumentada de múltiples receptores inhibidores, como el PD-1, pueden contribuir a dañar la función de células T. El PD-1 es un regulador negativo de las células T implicado en la apoptosis (237). En la infección por VIH-1, varios grupos observaron que la expresión aumentada de PD-1 estaba asociada con una menor producción citoquinas y una menor capacidad de proliferación de las células T CD8+ VIH-1-específicas (238-240). Además, se ha correlacionado altos niveles de expresión de PD-1 con altos niveles de viremia plasmática y con una menor cifra de células T CD4+ (238-240). También, la regulación a la alta del PD-1 se ha correlacionado

con la incapacidad de las células T CD8+ memoria específicas del VIH-1 en progresores típicos pero no en LTNP (241). Sin embargo, el empleo del TARV en progresores redujo los niveles de expresión de PD-1 de las células T CD8+ a los niveles observados en LTNP (242), aunque la función de estas células parece que no aumenta con el bloqueo del PD-1 (243).

Algunos autores han definido un fenotipo asociado con senescencia replicativa en las células T CD8+ específicas del VIH-1, caracterizado por la expresión aumentada de CD57 (244) y muestran un acortamiento de los telómeros característico de las células senescentes (245). Además, la expresión de CD57 vuelve a las células más susceptibles de sufrir muerte inducida por activación (244). Varios estudios sugieren que este fenotipo senescente, que aumenta con la edad (246), es el resultado de la estimulación antigénica crónica (244). Este fenotipo puede dañar a las células T CD8+ específicas del VIH-1 para diferenciarse en efectoras, contribuyendo así a la pérdida del control de la infección (247).

El papel de las células T CD4+ virus-específicas es esencial tanto en el mantenimiento como en la función de las respuestas de células T CD8+ (248,249). Las células T CD4+ activadas no sólo producen citoquinas implicadas en la actividad de las células T CD8+ (250), sino que también interaccionan específicamente con las células dendríticas a través de CD40-CD40L, activándolas como potentes inductores de la respuesta T CD8+ (251). Algunos autores piensan que la pérdida selectiva de las células T CD4+ VIH-1-específicas durante la infección por VIH-1 (168) podría contribuir a aumentar la sensibilidad a la apoptosis selectiva de las células T CD8+ VIH-1-específicas (252). Además, la reconstitución del CD28 en las

células T CD8⁺ CD28⁻ específicas del VIH-1 resulta en la restauración de la producción de IL2 para mantener su proliferación después de reconocer el antígeno, sugiriendo una mayor dependencia de las células T CD4⁺ en ausencia del CD28 (253).

Las células Treg son células T CD4⁺ caracterizadas por diferentes marcadores, como CD25, CD127 y FoxP3 ("*Forkhead box protein 3*") y son capaces de suprimir la activación y/o función de otras células T (254). Aunque se desconoce el papel de las Treg en la infección por VIH-1, parece que contribuye a la disfunción de la respuesta antiviral (255). La activación inmune asociada al VIH-1 parece promover la expansión y enriquecimiento de las células Treg (256,257), lo que afectaría al desarrollo de una respuesta inmune eficaz frente al virus. Los CE tienen un nivel bajo de células Treg comparado con los sujetos VIH-1+ virémicos, aunque este nivel bajo de Treg no difiere entre los individuos que controlan la replicación viral bien espontáneamente o bien inducida por el TARV (258). Sin embargo, un estudio observa que la supresión virológica bajo TARV no restablece los niveles de Treg (256).

Varios estudios han mostrado que tanto la capacidad proliferativa (171,184) como la actividad citotóxica, especialmente la expresión de perforina (233), de las células T CD8⁺ VIH-1-específicas se encuentran dañadas en los progresores típicos. Sin embargo, los CE pueden generar y mantener una respuesta de células T CD8⁺ específicas del VIH-1 capaz de degranular proteínas líticas (perforina y granzimas, principalmente) (242) y secretar múltiples citoquinas y quimiocinas (186), lo que puede explicar su alta capacidad citolítica sobre las células T CD4⁺ autólogas infectadas (259).

Además, estas células T CD8+ VIH-1-específicas de los CE, comparado con los progresores, tienen una capacidad superior de expresar perforina inmediatamente después de su activación (184,260).

8. Factores implicados en el control espontáneo de la replicación viral

No existe un factor único que explique el control espontáneo de la replicación viral observado en LTNP y CE, sino que numerosos factores tanto virales como del hospedador parecen estar implicados (112,115).

Varios estudios sugieren que los LTNPs y CE están infectados por virus defectivos (261-263), los cuales podrían explicar su estatus clínico. Sin embargo, hay evidencias de que muchos CE están infectados con virus totalmente patogénicos (106,264-267). En un estudio se observó que un CE infectó a un individuo que desarrolló SIDA, lo que sugería que el virus era patogénico (268). Además, el análisis del aislado viral del CE mostró que tenía una capacidad replicativa más reducida que la que presentaba el aislado del progresor, posiblemente debido a la presencia de mutaciones de escape del virus del CE que había desarrollado en respuesta a una fuerte presión inmunológica (268).

En la [Tabla 1](#) se resumen los mecanismos potenciales para el control de la infección por VIH-1 en los CE y LTNP. Varios estudios se dirigen a comprender las bases de la no progresión de la enfermedad y han sugerido que entre los factores del hospedador definidos en estos CE, una respuesta inmune celular más eficaz parece ser un factor determinante del control de la replicación viral (104,112,264).

Mecanismos	Evidencia en LTNP y CE	Referencias
RESPUESTA INMUNE INNATA		
Células NK	Determinados receptores de NK (KIR) implicados en regular la función de estas células están sobrerrepresentados	(269,270)
Células dendríticas	Mayor número respecto a progresores Producción de IFN γ , α -defensinas y otras citoquinas antivirales aumentada	(271,272) (148,273-275)
Entrada celular reducida	Polimorfismos genéticos del CCR5 (alelo CCR5 Δ 32) están asociados con un reducido número de correceptores y/o con mayor cantidad de ligandos CCR5	(276-278)
RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA		
Respuesta inmune humoral		
Anticuerpos neutralizantes	Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentada	(153,157,279)
Respuesta inmune celular		
Células T CD8+ específicas del VIH-1	Determinados alelos HLA-I protectores (como HLA-B*57 y B*27) implicados en el reconocimiento de las células infectadas están sobrerrepresentados	(111,112,161,280-285)
	Capacidad citotóxica en respuesta a péptidos VIH-1 aumentada	(242,259)
	Polifuncionalidad en respuesta a péptidos VIH-1 aumentada	(185,186)
	Proliferación en respuesta a péptidos VIH-1 aumentada	(184,186,286)
	Menor grado de activación y con un fenotipo particular de activación	(259,287)
	Menor expresión de marcadores relacionados con el agotamiento	(238-240,288)
Células T CD4+ específicas del VIH-1	Mantienen capacidad proliferativa en respuesta a péptidos VIH-1	(289-292)
	A menudo expresan altas cantidades de IL2 e IFN γ en respuesta a péptidos VIH-1	(287,293)
	No sobreexpresión de CTLA-4 observada en progresores (aguda, crónicos y bajo TARV)	(294,295)
	Menor expresión de marcadores relacionados con el agotamiento	(238,295)

Tabla 1. Mecanismos inmunológicos implicados en el control de la replicación del VIH-1 en LTNP y CE.

8.1. El sistema HLA y la respuesta inmune frente al VIH-1

Actualmente se han descrito varios tipos de HLA asociados con protección o con progresión de la enfermedad (Tabla 2). Así pues, el patrón HLA del individuo puede afectar a la respuesta inmune adaptativa y a la evolución de las mutaciones virales de escape (283,296-298). Las células T CD8+ de pacientes con HLA-B57 y B-58 pueden forzar al virus a desarrollar ciertas mutaciones en *gag*, permitiendo al virus escapar de la respuesta T CD8+, pero estas mutaciones reducen la capacidad replicativa del virus y, por tanto, disminuye la carga viral (181,264,299). Si este virus es transmitido a un individuo con un patrón HLA diferente, el virus puede volver a mutar a su genotipo original para reestablecer su capacidad replicativa total, debido a la ausencia de una presión inmunológica ejercida por las células T CD8+. Por otro lado, se han descrito alelos HLA-II asociados con LTNP, en los que existe una respuesta de células T CD4+ específicas del VIH-1 con capacidad para proliferar cuando se estimula con estos antígenos HLA-II (290).

A pesar de la identificación de varios alelos HLA-I con impacto en el curso de la infección por VIH-1 (300), actualmente esta determinación genética no influye en las decisiones para el manejo de la infección.

Progresión lenta	HLA-A*2601; HLA-A*2603; HLA-A*32; HLA-A*7401. HLA-B*1302; HLA-B*1401; HLA-B*1402; HLA-B*1503; HLA-B*1509; HLA-B*1516; HLA-B*1517; HLA-B*2705; HLA-B*3801; HLA-B*5101; HLA-B*5701; HLA-B*5702; HLA-B*5703; HLA-B*8101; HLA-B*5801. HLA-C*08; HLA-C*18.
Progresión rápida	HLA-A*1; HLA-A*23; HLA-A*24; HLA-A*29. HLA-B*0702; HLA-B*0703; HLA-B*0704; HLA-B*0705; HLA-B*1801; HLA-B*3502; HLA-B*3503; HLA-B*5301; HLA-B*5802. HLA-C*16; HLA-Cw04.

Tabla 2. Lista de algunos alelos HLA-I que han sido relacionados con protección y con progresión rápida de la infección por VIH-1.

8.2. Respuesta de células T CD8+ capaz de controlar la replicación viral

Una respuesta antiviral de células T CD8+ *eficiente* es definida por ser aquella capaz de controlar la replicación viral y, por tanto, la progresión de la infección y el riesgo de contraer infecciones oportunistas (301). Actualmente, se están investigando cuáles son los mecanismos moleculares y celulares que determinan esta respuesta eficiente.

Las características de la respuesta T CD8+ específica del VIH-1 que podrían estar implicados en el control de la replicación viral son la magnitud, la amplitud y la calidad. En cuanto a la magnitud (o frecuencia) de células T CD8+ específicas del VIH-1, inicialmente se observó que existía una correlación inversa con la carga viral (36), pero estudios posteriores no han demostrado ninguna correlación (172,302-304). Tampoco se ha encontrado una correlación entre la amplitud de la respuesta y el control de la replicación viral o la protección frente a la progresión de la enfermedad (304). En cambio, estudios recientes sugieren que existe una importante relación entre la calidad de la respuesta T CD8+ específica del VIH-1 y el control inmunológico (171,186). Los factores que definen la calidad de esta respuesta continúan estudiándose, pero, quizás uno de los más importantes, sea la capacidad para producir varios factores solubles simultáneamente (capacidad polifuncional) como factor de efectividad de las células T (186).

Betts y colaboradores (186) acuñan el concepto de polifuncionalidad como una medición de la calidad de la respuesta celular y sugieren que los pacientes que controlan espontáneamente la infección por VIH-1 presentan una respuesta T CD8+ específica del VIH-1 polifuncional comparado con los progresores típicos. Estudios porteriores han verificado que la calidad más

que la cantidad de células T CD8+ específicas del VIH-1 está asociada con un control efectivo de la replicación viral (305-308), incluso, a nivel de la mucosa rectal (187,309). Sin embargo, una mejor calidad de la respuesta inmune específica del VIH-1 no explica totalmente el control parcial de la replicación viral observado en los CE. Además, las diferencias pueden reflejar una influencia de la replicación viral en la calidad de la respuesta de células T CD8+. De este modo, se han diseñado estudios longitudinales para averiguar si la supresión virológica bajo TARV es capaz de restaurar la funcionalidad de las células T, aunque continúa siendo un tema controvertido. López y colaboradores (310) no observaron ningún cambio en la respuesta T CD8+ específica del VIH-1 después de 12 meses de supresión virológica bajo TARV en sujetos VIH+ crónicos, mientras que en otro estudio se sugiere que una supresión virológica prolongada durante 2 años era capaz de restaurar la polifuncionalidad en las células T (311). Sin embargo, estos resultados no pueden descartar la posibilidad de que después de un impacto prolongado de TARV en pacientes VIH+ crónicos, la respuesta T CD8+ específica del VIH-1 mejore, por lo que aún no queda claro si las células T CD8+ polifuncionales son la causa o la consecuencia de una baja viremia plasmática. Por tanto, son necesarios más estudios longitudinales con un seguimiento a largo plazo con TARV para clarificar este tema.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Estudiar a los CE proporciona una buena oportunidad para poder identificar aquellos elementos cruciales para el diseño de una vacuna eficaz. La respuesta inmune celular tiene un papel fundamental en el control de la replicación del VIH-1 (34,35,37-39,287). Se apunta que los LTNP presentan una mejor calidad de la respuesta de las células T CD8+ VIH-1-específica que los progresores típicos (186,187,305-309), pero no queda claro si esta calidad de la respuesta es la determinante o, en cambio, la consecuencia de un bajo nivel de viremia plasmática. Si la replicación del VIH-1 es la causa de la disfunción de las células T CD8+ VIH-1-específicas, entonces los pacientes que alcanzan viremia indetectable bajo TARV desarrollarían *de novo* células T CD8+ VIH-1-específicas funcionales, alcanzando un perfil funcional similar al de los CE. Por tanto, la eliminación de la viremia ayudaría a restaurar el perfil de producción de citoquinas de las células T CD8+. Para probar esta hipótesis, se analizó la evolución del perfil funcional de la respuesta de las células T CD8+ VIH-1-específicas durante 4 años de seguimiento en diferentes grupos de pacientes VIH-1+. Además, para intentar establecer la relación causa-efecto entre la replicación viral y la calidad de la respuesta de células T CD8+, se analizó el efecto de la supresión viral inducida por el TARV sobre el perfil funcional de las células T CD8+ VIH-1-específicas en pacientes VIH-1 crónicos antes y después de iniciar TARV a corto y a largo plazo manteniendo una viremia suprimida. Este tema también se abordó analizando el efecto de la interrupción del TARV sobre el perfil funcional de las células T CD8+ VIH-1-específicas en pacientes que habían mantenido viremia indetectable durante al menos 1 año antes de la interrupción del TARV.

OBJETIVOS

- 1- Analizar y comparar longitudinalmente el perfil funcional de las células T CD8+ específicas de Gag y de Nef durante un periodo de 4 años de seguimiento bajo diferentes condiciones: 1) viremia indetectable controlada de forma espontánea (controladores de élite) o bajo tratamiento antirretroviral (supresores virémicos); 2) viremia persistente a bajo nivel (controladores virémicos) o a alto nivel (progresores típicos sin tratamiento antirretroviral).
- 2- Evaluar longitudinalmente el impacto de la supresión viral completa inducida por el tratamiento antirretroviral durante un periodo de 5 años sobre el perfil funcional de las células T CD8+ específicas frente a Gag y Nef.
- 3- Evaluar longitudinalmente el impacto de la replicación viral tras 1 año de interrupción del tratamiento antirretroviral sobre el perfil funcional de las células T CD8+ específicas frente a Gag y Nef.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. Características de los sujetos de estudio

En este estudio retrospectivo, fueron incluidos 81 pacientes con infección crónica por VIH-1 que regularmente acuden a las consultas del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III de Madrid. Las principales características de los pacientes VIH-1+ se resumen en la [Tabla 3](#). También en este hospital se sigue regularmente a una cohorte de pacientes que cumplen los criterios de LTNP (109), definidos por estar asintomáticos durante más de 10 años de infección y con un recuento de células T CD4+ por encima de 500 células/ μ l en ausencia de TARV. De esta cohorte de LTNP, se analizaron muestras de 16 individuos que fueron divididos en 2 categorías según el rango de carga viral:

- **8 Controladores virémicos (CV)**, con una carga viral entre las 50 y 8000 copias/ml.
- **8 Controladores de élite (CE)**, cuya carga viral se mantiene persistentemente indetectable (<50 copias/ml).

El resto de los pacientes corresponde a una cohorte de progresores típicos que fueron divididos en 3 grupos:

- **46 Progresores típicos *naïve* para el TARV (PT)**, que fueron reclutados por no haber estado en TARV antes de la inclusión en el estudio.
- **47 Progresores típicos tratados con TARV (PTARV)**, en los cuales la carga viral se mantuvo persistentemente indetectable tras el inicio de TARV (<50 copias/ml).

- **9 Pacientes con interrupción del TARV (PIT).** Después de estar en TARV durante más de 5 años y mostrando repetidamente una cifra de CD4+ superior a 500 células/ μ l y una carga viral indetectable, el TARV fue interrumpido por petición del paciente. Todos los pacientes sufrieron un rebrote viral con una mediana de carga viral de 4,35 [0,77] log copias/ml y una disminución de la cifra de CD4+ entre el momento basal antes de interrumpir el tratamiento y después de 1 año de interrupción de dicho tratamiento (646 [378] vs. 420 [262], $p=0,018$).

De todos los pacientes se obtuvo el consentimiento informado para la utilización de sus muestras en nuestros estudios y el protocolo de estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Ético del hospital.

2. Recuento de linfocitos T CD4+

El recuento de linfocitos T CD4+ se evaluó por citometría de flujo. A partir de sangre total, previamente lisada con el kit IMMUNOPREP (Beckam-Coulter, Miami, FL, USA), se realizó un marcaje directo de los linfocitos T CD4+ usando el kit CYTO-STAT®tetraCHROME™ (Beckam-Coulter, Miami, FL, USA) y se analizó posteriormente en el citómetro de flujo (FC500, Beckam-Coulter, Fullerton, CA, USA). El resultado se expresa como cifra absoluta de CD4+/ μ l de sangre.

Tabla 3. Principales características de los grupos de pacientes VIH-1+ del estudio.

Características	LTNP		PT	PTARV	PIT	p-valor
	CE	CV				
N	8	8	46	47	9	
Sexo (% hombres)	88	100	87	83	78	<i>n.s.</i>
Edad (años)	46 [5]	43 [10]	45 [11]	45 [9]	45 [8]	<i>n.s.</i>
CD4 (cél/s/μl)	792 [383]	774 [382]	403 [294]	513 [331]	420 [262]	<i><0.01</i>
Carga viral (log ₁₀ copias/ml)	1,69 [0]	3,11 [1.38]	4,52 [0,78]	1,69 [0]	4.34 [0,77]	<i><0.001</i>
Tiempo seguimiento (años)	11 [11]	14 [5]	2 [5]	4 [10]	13 [9]	<i><0.001</i>
Coinfección VHC (%)	50	81	27	54	50	<i><0.005</i>
Coinfección VHB (%)	0	7	7	12	0	<i>n.s.</i>
Grupo de riesgo (%)						<i>n.s.</i>
ADPV	60	86	27	27	29	
Homosexual	0	14	52	46	43	
Heterosexual	20	0	18	24	28	
Desconocido	20	0	3	3	0	

Los datos se muestran como mediana y [amplitud intercuartílica].

n.s. no significativo

3. Cuantificación de la viremia plasmática

La carga viral plasmática fue determinada a través de un ensayo comercial de *bDNA* (*branched DNA assay*; Versant HIV-1 RNA 3.0 assay, Siemens, Barcelona, España), con un rango de detección de entre 50 a 500.000 copias/ml de plasma.

4. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Las muestras de sangre de los pacientes fueron obtenidas por punción venosa en tubos Vacutainer con EDTA. Las CMSP fueron inmediatamente aisladas usando centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a 840 x g durante 30 minutos.

Para la criopreservación de CMSP, se alicuotaron de entre 5 a 10 millones de células por alícuota, añadiéndoles 90% de suero bovino fetal (SBF; BioWhittaker, Lonza) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma, St. Louis, MO). Las primeras 24h fueron mantenidas a -80°C en un baño de metanol y, posteriormente, se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido (-196°C). Todos los estudios inmunológicos fueron realizados empleando CMSP criopreservadas.

La descongelación de las CMSP se realizó en baño de agua a 37°C y se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo completo R10 (RPMI 1640 conteniendo 10% de SBF, 1% de Penicilina/Estreptomicina (todos de BioWhittaker, Lonza), 2% de L-Glutamina (BioWhittaker, Cambrex) y 0,1% de Gentamicina (GIBCO, Invitrogen)). La viabilidad de las CMSP tras la descongelación fue siempre mayor del 85%.

5. Péptidos óptimos del VIH-1

Se utilizaron dos grupos de péptidos de las proteínas Gag y Nef del VIH-1 que previamente han sido definidos como óptimos de respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1, con una longitud de entre 9 y 11 aminoácidos. Un grupo comprendía la proteína Gag (50 péptidos) y el otro la

proteína Nef (25 péptidos), como vienen descritos en *Los Alamos Molecular Immunology Database 2008*. Los péptidos fueron sintetizados con una pureza mayor del 98% (Peptide Synthesis Facility, Universidad Autónoma, Barcelona, España). Los péptidos individuales liofilizados fueron resuspendidos en DMSO a una concentración de 400 µg/ml, mezclados para obtener los 2 grupos (Gag y Nef), alicuotados y almacenados a -80°C. La concentración final de cada péptido en los cultivos fue de 1 µg/ml.

6. Respuesta de las células T CD8+ específicas del VIH-1

En una placa de 96 pocillos (fondo en “U”), se cultivó un millón de CMSP con 5 µl de cada grupo de péptidos (1 µg/ml) y en presencia de las moléculas co-estimuladoras CD28 (1 µg/ml) y CD49d (1 µg/ml) (BD eBiosciences Pharmingen) durante 6 horas a 37°C y 5% CO₂. El inhibidor del transporte celular BD GolgiPlug (1 µl/10⁶ CMSP; BD eBiosciences Pharmingen), que contiene Brefeldina A, fue añadido después de la primera hora de cultivo. Como control positivo se estimuló con PMA (50 ng/ml, del inglés, *phorbol 12-myristate 13-acetate*) e Ionomicina (1 µM) (ambos de Sigma-ALdrich, St Louis, MO, USA). Después de las 6 horas de cultivo, las células se mantuvieron a 4°C durante toda la noche para ser procesadas al día siguiente.

Las células estimuladas fueron recogidas, lavadas con PBS 1x e incubadas con anti-CD8α-Phycoerythrin-Texas Rex®-X (ECD, Beckmann-Coulter) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con 250 µl de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) durante 20 minutos a 4°C. Las células permeabilizadas

fueron lavadas con 2 ml de Perm/Wash (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) y después incubadas con anti-MIP1 β -fluorescein isothiocyanate (FITC, R&D Systems), anti-IL2-phycoerythrin (PE, Beckmann Coulter) y anti-TNF α -PE-Cyanine dye 7 (PECY7, Beckmann Coulter) durante 30 minutos a 4°C. Tras la tinción, las células fueron lavadas de nuevo con 2 ml de Perm/Wash y resuspendidas en 250 μ l de PBS 1x para la adquisición en el citómetro de flujo FC500.

Para cada muestra se analizó un mínimo de 50.000 células que eran CD8^{brillante}. El análisis de los datos se realizó usando el software CXP (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). En base a la producción de los factores intracelulares MIP1 β , TNF α e IL2, se identificaron siete poblaciones funcionalmente diferentes de células T CD8⁺ específicas de antígeno (Figura 7).

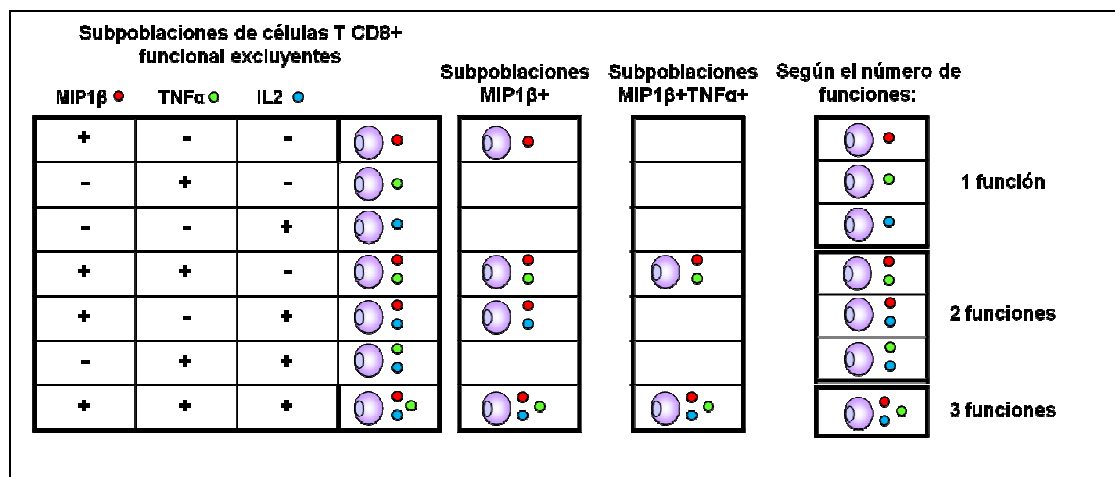


Figura 7. Representación del análisis de las 7 subpoblaciones de células T CD8⁺ funcional excluyentes en base a la producción de MIP1 β , TNF α e IL2. A continuación, dos ejemplos en el que se muestran las subpoblaciones que producen MIP1 β y las que coproducen MIP1 β y TNF α . Por último, se indica las subpoblaciones de células T CD8⁺ con 1, 2 y 3 funciones.

Para cada subpoblación, un nivel de 0,05% de células T CD8+, tras restar el control negativo, fue considerado como umbral para una respuesta específica positiva. Además, también se analizaron todas las células T CD8+ que producían una (MIP1 β +, TNF α + o IL2+) o dos moléculas diferentes (MIP1 β +TNF α +, MIP1 β +IL2+ o TNF α +IL2+). Finalmente, se examinó el número de funciones en las células T CD8+, definido como el número de moléculas diferentes producidas por la misma célula. El nivel de respuesta de células T CD8+ específicas de antígeno fue definido como la suma de las respuestas obtenidas por cada subpoblación funcional excluyente. La contribución a la respuesta global de cada subpoblación de células T CD8+ fue expresada como la proporción de la respuesta global atribuible a cada subpoblación. En la [Figura 8](#) se muestra un ejemplo sobre la estrategia de análisis de las subpoblaciones.

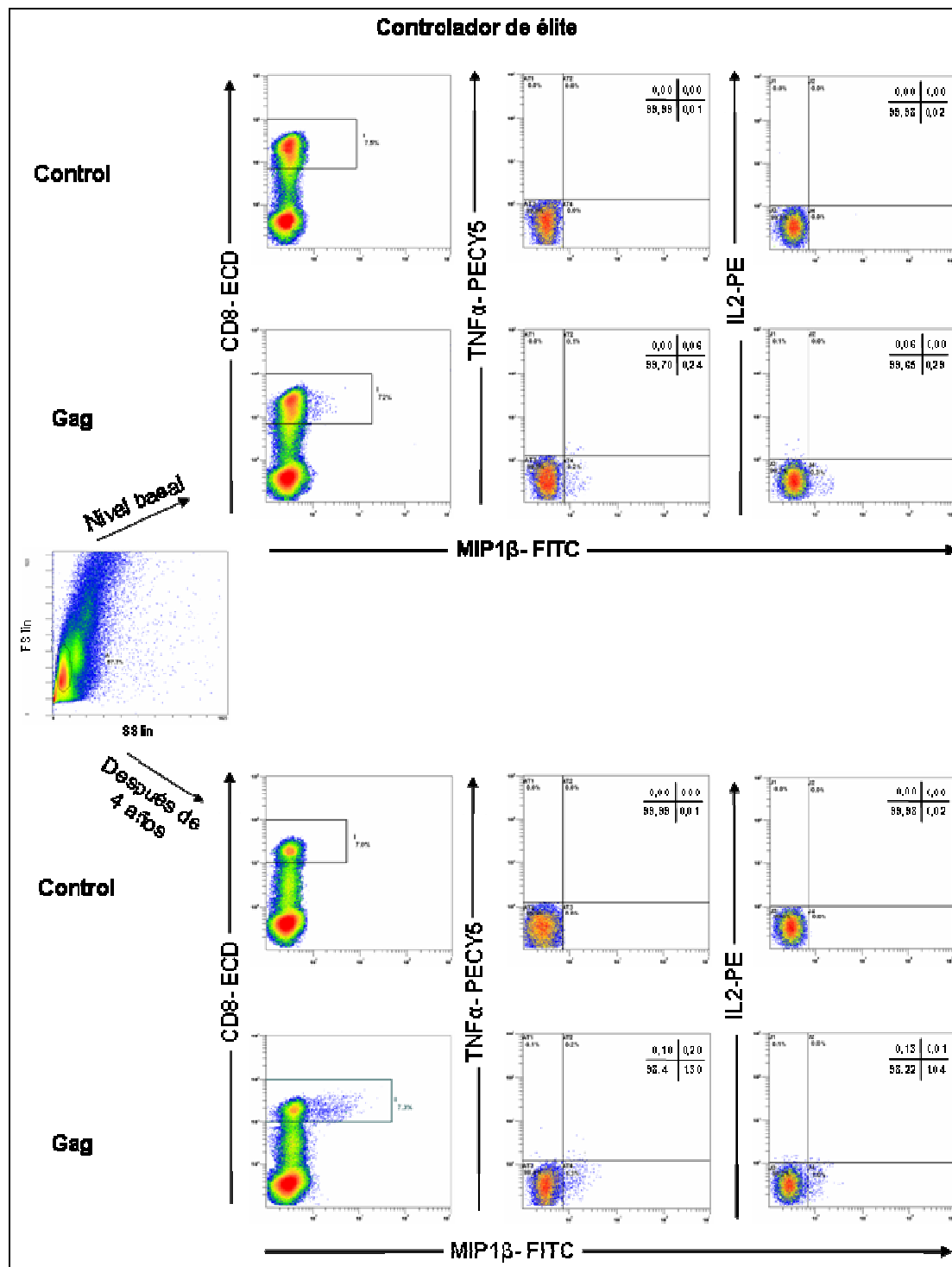


Figura 8. Análisis representativo sobre las imágenes obtenidas en el citómetro de flujo de la evolución de la respuesta de células T CD8+ específicas de Gag en un controlador de élite. Se muestra la producción de MIP1β, TNFα e IL-2 por las células T CD8+ sin estimular (control) y estimuladas con péptidos óptimos de Gag a nivel basal y después de 4 años de seguimiento.

7. Capacidad de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1

En una placa de 48 pocillos (fondo plano), un millón de CMSP se cultivó en medio R10 que contenía IL7 (50 ng/ml) durante 10 días a 37°C y 5% de CO₂ y en presencia de grupos de péptidos óptimos de Gag y Nef. Como control de una proliferación inespecífica, se cultivó una alícuota de células en ausencia de péptidos VIH. Al tercer día, se añadieron 500 µL de R10 pero sin IL-7. Al quinto día, se retiraron 500 µL del pocillo y se añadieron otros 500 µL de R10 con IL-2 a 80 UI/mL. Al octavo día, se volvió a cambiar el medio y se añadieron otros 500 µL R10 con IL-2 a 40 UI/mL. Al décimo día, las células no estimuladas fueron repartidas en dos alícuotas para ser estimuladas con péptidos Gag y Nef como controles de expansión inespecífica. Las células estimuladas con Gag y Nef volvieron a ser reestimuladas con Gag y Nef, respectivamente. Brevemente, tras la incubación de 6 h, las células fueron lavadas, permeabilizadas y teñidas con el mismo panel de AcMo descrito anteriormente (apartado “Respuesta de las células T CD8+ específicas del VIH-1”).

Para cada muestra se analizó un mínimo de 50.000 células que eran CD8^{brillante}. La estrategia del análisis de las imágenes obtenidas del citómetro de flujo era la misma que la utilizada para el análisis de la respuesta de células T CD8+. Se analizó el nivel de expansión de las diferentes subpoblaciones T CD8+ específicas de Gag y de Nef y se expresó como la ratio entre el nivel de cada subpoblación en las células estimuladas durante el cultivo y aquellas que no fueron estimuladas durante el cultivo. El punto de corte para considerar una expansión significativa se estableció en una ratio mayor o igual a 3. Este punto de corte se estableció en base a la media de

expansión en un grupo de controles sanos a la que se sumó 2 veces la desviación estándar.

8. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando el paquete estadístico SPSS versión 15 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Tras aplicar la Prueba de Normalidad de Kolgomorov-Smirnov, la mayoría de las variables analizadas tenían una distribución no paramétrica, de modo que los resultados fueron expresados como mediana y amplitud intercuartílica.

Para el estudio transversal, la prevalencia de una variable en los diferentes grupos de estudio fue hallada mediante tablas de contingencia, mientras que para evaluar las diferencias en la prevalencia de las diversas variables dentro de un mismo grupo y entre grupos se realizó un análisis Chi-cuadrado. La prueba U de Mann-Whitney se empleó para comparar una variable cuantitativa en diferentes grupos. Para el estudio longitudinal, se aplicó el test de McNemar para hallar cambios en la prevalencia y el test de Wilcoxon para las variables cuantitativas. Las asociaciones entre las variables fueron examinadas usando el coeficiente de correlación de Spearman.

RESULTADOS

1. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en pacientes con diferente progresión de la infección por VIH-1 durante 4 años

1.1. Población de estudio

En este estudio se incluyeron 8 controladores de élite (CE), 8 controladores virémicos (CV), 10 progresores típicos *naïve* para el TARV (PT) y 10 progresores tratados con supresión de la viremia (PTARV). En la [Tabla 4](#) se muestran las características inmunológicas y virológicas de estos pacientes al inicio y al final del seguimiento.

Tabla 4. Características inmunológicas y virológicas de los pacientes en el estudio.

Grupos	N	Tiempo infección (años)	Cifra de CD4+ (células/ μ L)		<i>p</i> -valor	Carga viral (\log_{10} copias/mL)		<i>p</i> -valor
			Nivel basal	Después de 4 años		Nivel basal	Después de 4 años	
CE	8	11 [11]	792 [383]	972 [800]	<i>n.s.</i>	1.69 [0]	1.69 [0]	<i>n.s.</i>
CV	8	14 [5]	774 [382]	619 [208]	<i>n.s.</i>	3.11 [1.38]	3.34 [0.90]	<i>n.s.</i>
PT	10	3 [7]	607 [458]	426 [167]	0.028	4.01 [0.62]	4.40 [0.69]	0.037
PTARV	10	4 [5]	383 [123]	742 [354]	0.012	1.69 [0]	1.69 [0]	<i>n.s.</i>

Los datos se muestran como mediana y [amplitud intercuartílica].

n.s. no significativo

En los sujetos PT, la cifra de CD4+ disminuyó significativamente (607 [458] vs. 426 [167]; $p=0.028$), mientras que la carga viral aumentó al final de los 4 años de seguimiento (4.01 [0.62] vs. 4.40 [0.69]; $p=0.037$). Por el

contrario, en los pacientes PTARV, en los cuales la carga viral se mantuvo indetectable durante los 4 años del estudio, la cifra de CD4+ aumentó significativamente (383 [123] vs. 742 [354]; $p=0.012$). Tanto la cifra de CD4+ como la carga viral se mantuvieron estables en CV y CE.

1.2. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en progresores típicos

Casi el 100% de los pacientes PT presentaron niveles detectables de respuesta de células T CD8+ específicas de Gag y de Nef tanto a nivel basal como después de 4 años de seguimiento. No hubo cambios en el nivel de respuesta total de las células T CD8+ frente a Gag (2% [2] vs. 2% [2]; [Figura 9.A.](#)) y Nef (2% [3] vs. 2% [2]; [Figura 9.B.](#)) al cabo de 4 años de seguimiento.

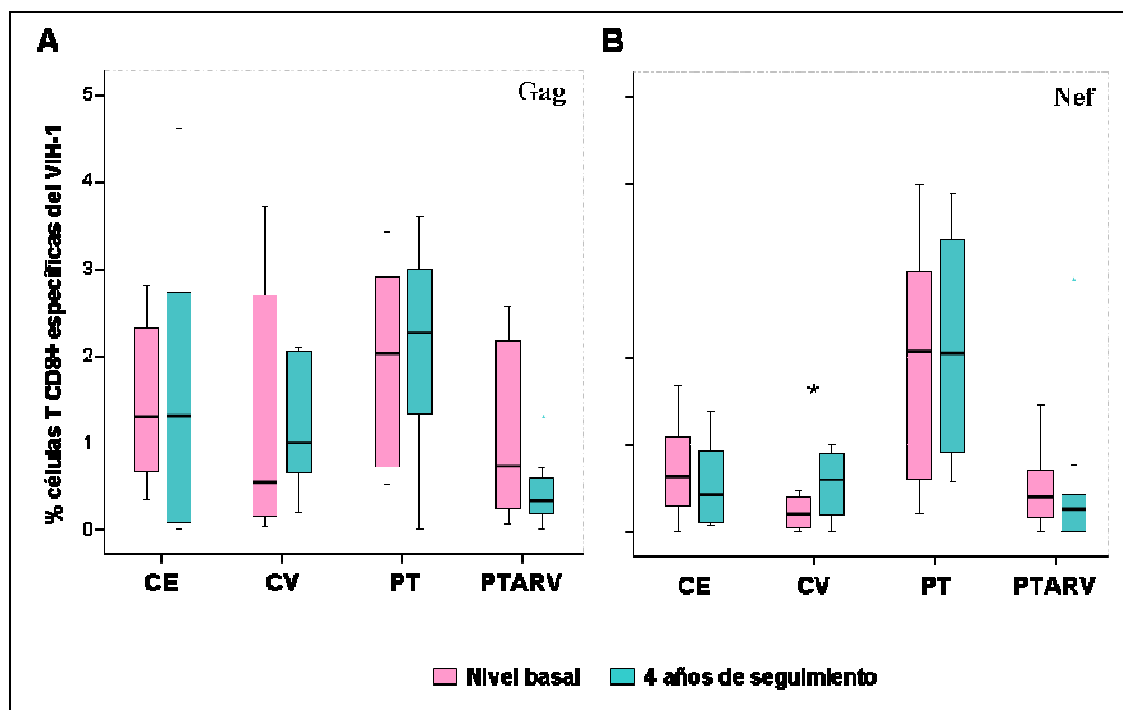


Figura 9. Representación del nivel de respuesta total de células T CD8+ específicas del Gag (A) y de Nef (B) en cada grupo de pacientes analizado comparando nivel basal y después de 4 años de seguimiento. * $P < 0,05$.

La [Figura 10](#) resume la contribución de cada una de las subpoblaciones a la respuesta total de las células T CD8+ frente a Gag y Nef en sujetos PT. Las subpoblaciones con mayor contribución a nivel basal fueron MIP1 β +TNF α -IL2- (61% [27] para Gag y 65% [26] para Nef) y MIP1 β +TNF α +IL2- (14% [26] para Gag y 13% [14] para Nef), seguidas de MIP1 β -TNF α -IL2+ para Gag (3% [33]) y MIP1 β -TNF α +IL2- para Nef (5% [31]). Después de 4 años de seguimiento, se observó que los 3 pacientes con células T CD8+ que simultáneamente producían las 3 moléculas a nivel basal, perdieron esta subpoblación al cabo de 4 años de seguimiento ([Figura 11](#)). En respuesta a Nef, aunque las subpoblaciones que más contribuyeron a la respuesta total de las células T CD8+ no cambiaron, se observó la desaparición de la subpoblación MIP1 β -TNF α +IL2- (5% [31] vs. 0% [16]) y la aparición de la subpoblación MIP1 β -TNF α -IL2+ (0% [13] vs. 9% [29]) después de 4 años.

Analizando el nivel de contribución de cada una de las moléculas en respuesta a Gag, las células que producían MIP1 β fueron las que más contribuyeron tanto a nivel basal como después de 4 años (87% [33] vs. 88% [35]), seguidas por las subpoblaciones TNF α + (30% [22] vs. 24% [32]) e IL2+ (20% [42] vs. 3% [37]). Se observó un perfil similar en respuesta a Nef (83% [38] vs. 84% [41] para MIP1 β +; 29% [20] vs. 21% [30] para TNF α +; y 6% [14] vs. 6% [22] para IL-2).

Según el número de funciones que presentan las células T CD8+ específicas del VIH-1, la contribución de las subpoblaciones con una función a la respuesta T CD8+ total frente a Gag y Nef tendió a aumentar (70% [33] vs. 87% [26], $p=0,052$ para Gag; 86% [13] vs. 92% [16], $p=0,059$ para Nef).

Sin embargo, las subpoblaciones con dos funciones tendieron a disminuir a lo largo del tiempo (20% [29] vs. 13% [24], $p=0,054$ para Gag y 14% [13] vs. 8% [16], $p=0,055$ para Nef).

Para valorar si existió una evolución inmune diferencial de acuerdo con la especificidad de la respuesta de células T CD8+, se comparó el perfil funcional de las células T CD8+ específicas de Gag con las específicas de Nef tanto a nivel basal como después de 4 años de seguimiento. No se observaron diferencias significativas en los perfiles funcionales de Gag y de Nef en los dos tiempos analizados. Por último, no se encontró ninguna asociación entre el perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ específicas de Gag y de Nef con la carga viral y/o la cifra de CD4 durante el seguimiento.

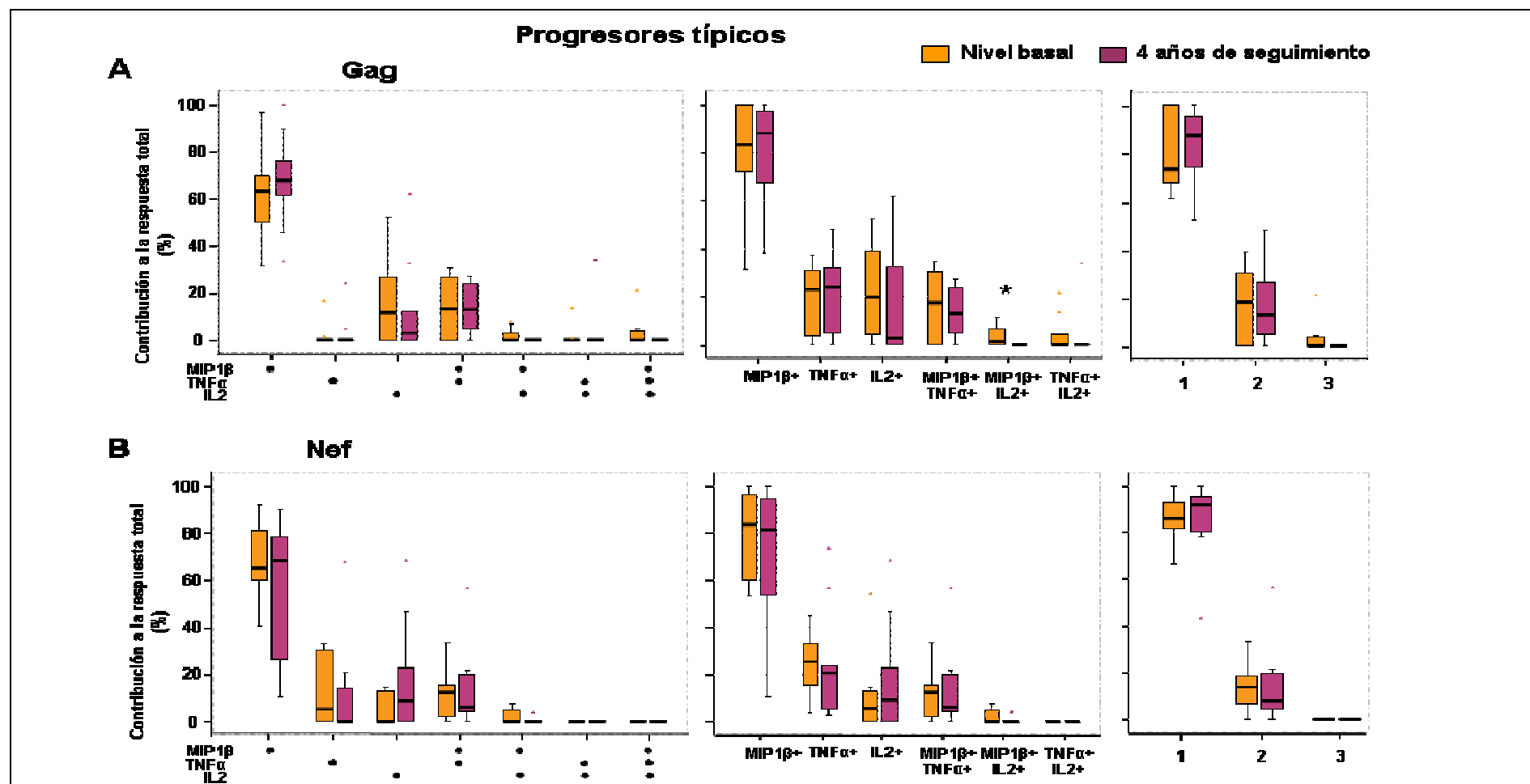


Figura 10. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ en progresores típicos *naïve* para TARV. Las gráficas muestran la contribución a la respuesta total frente a Gag (A) y Nef (B) de las 7 subpoblaciones funcionales excluyentes (gráficas izquierda), de las distintas subpoblaciones de acuerdo a la producción de 1 ó 2 moléculas (gráficas centro) y de las subpoblaciones según el número de funciones (gráficas derecha). * $P < 0,05$.

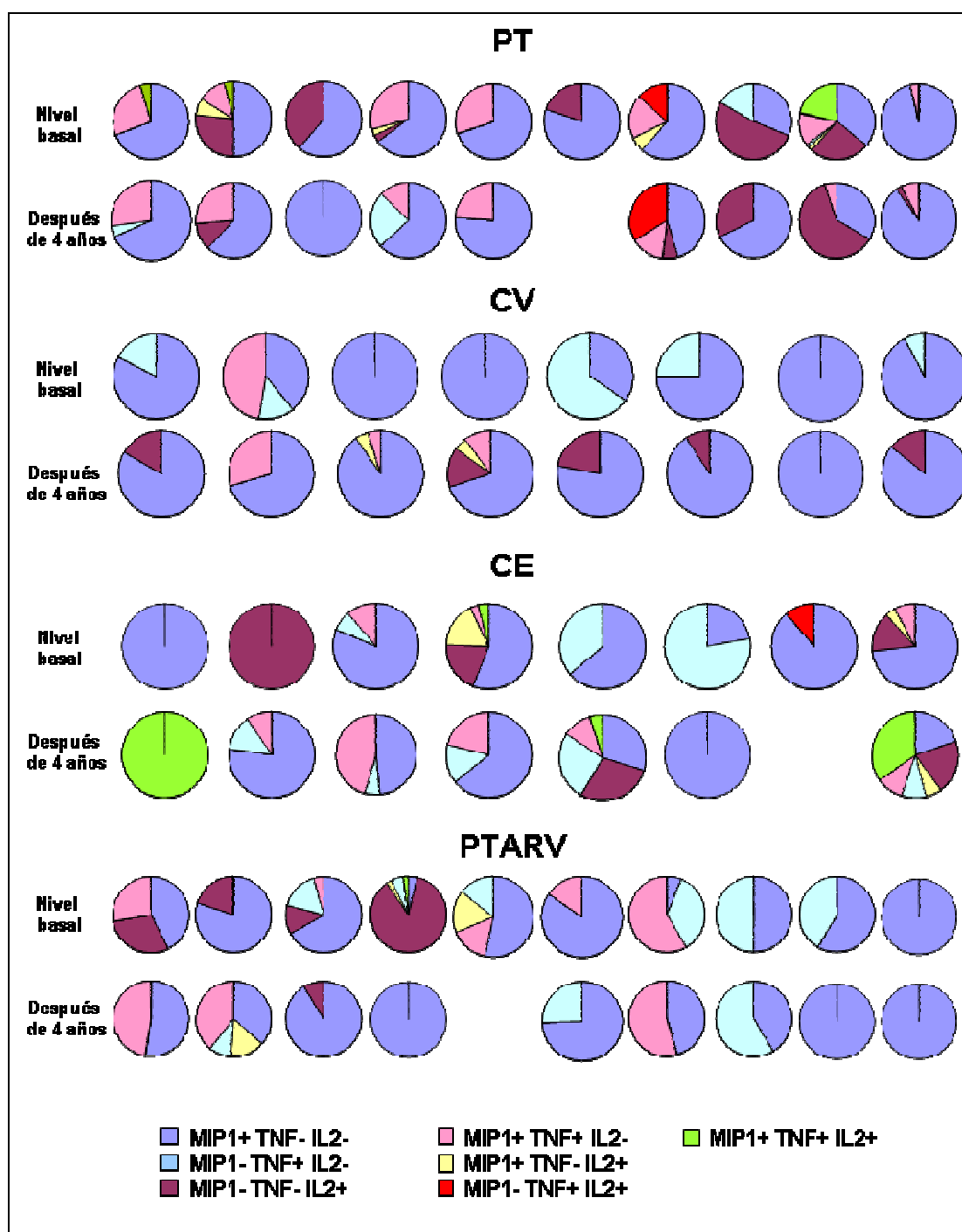


Figura 11. Evolución del perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ específicas de Gag. Se representan las contribuciones de las 7 subpoblaciones funcionales excluyentes en cada paciente VIH-1 analizado a nivel basal y después de 4 años de seguimiento.

1.3. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en controladores virémicos

La respuesta de las células T CD8+ fue detectable en el 100% de los pacientes frente a Gag y en el 88% de los pacientes frente a Nef tanto a nivel basal como después de 4 años. La respuesta total de las células T CD8+ frente a Gag tendió a aumentar (0,5% [3,1] vs. 1,0% [1,5], $p=0,056$; [Figura 9.A.](#)) y frente a Nef aumentó significativamente (0,3% [3] vs. 0,7% [0,7], $p=0,036$; [Figura 9.B.](#)).

La [Figura 12](#) muestra la evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas de Gag y de Nef en CV. A nivel basal, las subpoblaciones MIP1 β +TNF α -IL2- y MIP1 β -TNF α +IL2- fueron las que más contribuyeron a la respuesta T CD8+ total frente a Gag (88% [52] y 11% [23]) y Nef (54% [84] y 29% [84]). Después de 4 años, ambas respuestas evolucionaron de manera diferente. Para Gag, la contribución de la subpoblación MIP1 β -TNF α +IL2- disminuyó (11% [23] vs. 0%, $p=0,043$; [Figuras 11 y 12](#)), mientras que la contribución de MIP1 β -TNF α -IL2+ apareció *de novo* en respuesta a Gag (0% vs. 12% [16], $p=0,043$; [Figuras 11 y 12](#)). Sin embargo, para Nef, aunque la subpoblación MIP1 β -TNF α +IL2- tendió a disminuir (29% [84] vs. 0%, $p=0,080$), no se observaron diferencias significativas en las contribuciones del resto de subpoblaciones excluyentes a nivel basal y después de 4 años de seguimiento.

A nivel basal, las subpoblaciones MIP1 β + mostraron la mayor contribución en la respuesta total frente a Gag y Nef, la cual se mantuvo después de 4 años de seguimiento. Interesantemente, la contribución de TNF α + desapareció después de 4 años (13% [52] vs. 0%, $p=0,041$ para

Gag; y 46% [84] vs. 0% $p=0,028$ para Nef), mientras que la de IL2+ apareció *de novo* para Gag (0% vs. 12% [18], $p=0,018$; [Figura 12](#)).

En las respuestas para ambas especificidades, las células T CD8+ con una sola función predominaron a lo largo del seguimiento (100% [0] vs. 100% [14] para Gag; y 100% [19] vs. 100% [5] para Nef).

Se comparó el perfil funcional de la respuesta frente a Gag con el perfil funcional de la respuesta frente a Nef tanto a nivel basal como después de 4 años de seguimiento. A nivel basal, la contribución de las subpoblaciones MIP1 β + tendió a ser mayor en respuesta a Gag que a Nef (90% [23] vs. 71% [84], $p=0,046$, para Gag y Nef, respectivamente), mientras que la contribución de las subpoblaciones TNF α + fue significativamente mayor en respuesta a Nef que a Gag (46% [81] vs. 12% [52], $p=0,028$, para Nef y Gag, respectivamente). Por último, se observó una correlación inversa entre los cambios en el nivel de respuesta total de las células T CD8+ específicas de Gag y los cambios en la carga viral después de ajustar por la cifra de CD4+ ($R = -0,941$; $p = 0,005$; [Figura 13](#)).

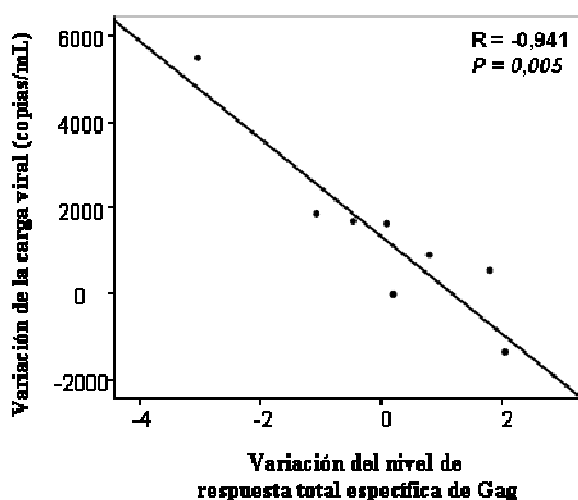


Figura 13. Correlación negativa entre la variación de la carga viral y la variación del nivel de respuesta total específica de Gag observada en CV.

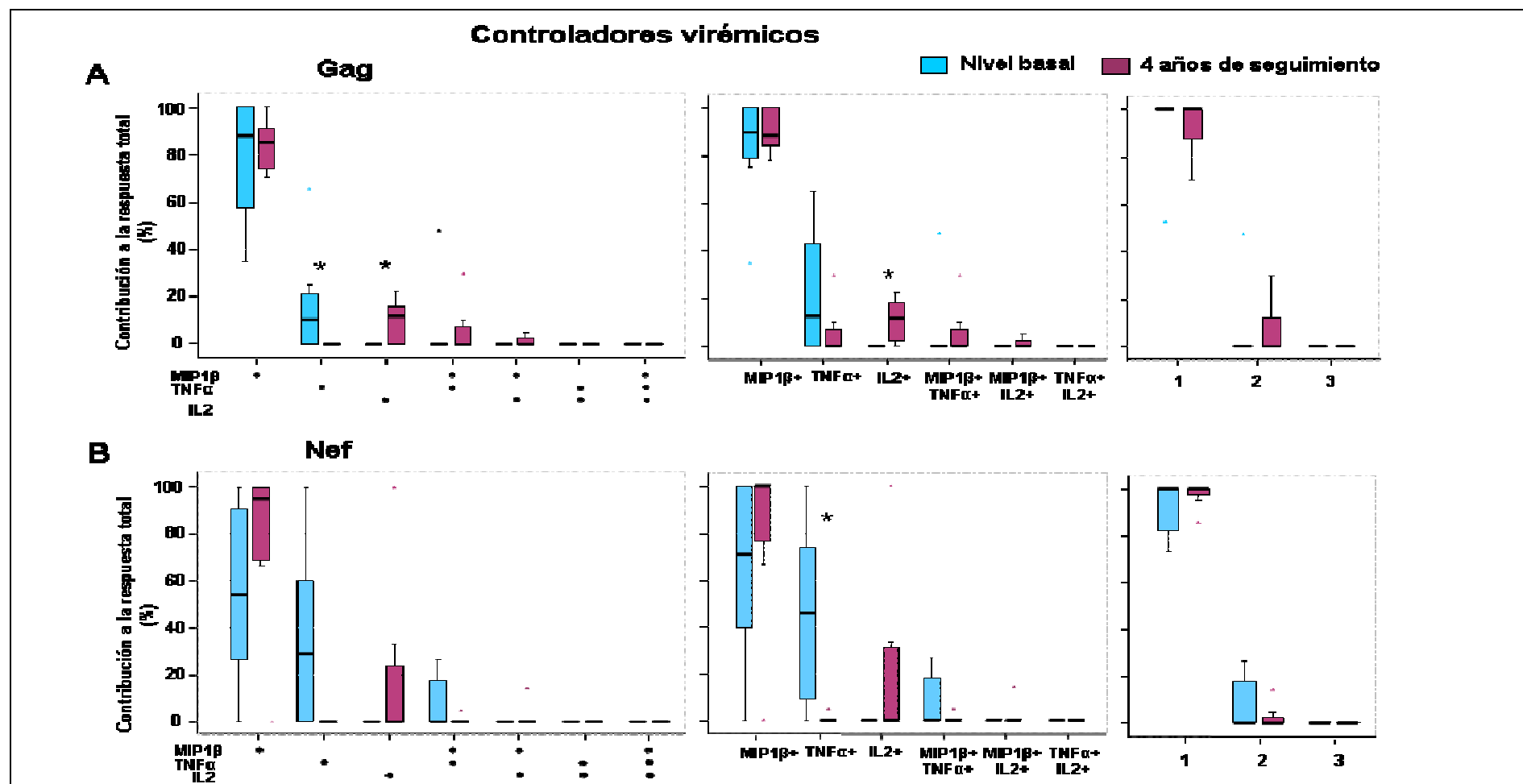


Figura 12. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ en controladores virémicos. Las gráficas muestran la contribución a la respuesta total frente a Gag (A) y Nef (B) de las 7 subpoblaciones funcionales excluyentes (gráficas izquierda), de las distintas subpoblaciones de acuerdo a la producción de 1 ó 2 moléculas (gráficas centro) y de las subpoblaciones según el número de funciones (gráficas derecha). * $P < 0,05$.

1.4. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en controladores de élite

Todos los CE tuvieron nivel detectable de respuesta de células T CD8+ específicas de Gag y de Nef tanto a nivel basal como después de 4 años de seguimiento. No se encontró ninguna variación significativa en la respuesta total de las células T CD8+ frente a Gag (1,07% [1,75] vs. 1,36% [3,97]; [Figura 9.A.](#)) y Nef (0,69 [0,59] vs. 0,63 [1,06]; [Figura 9.B.](#)) después de 4 años de seguimiento.

La [Figura 14](#) muestra la evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas de Gag y de Nef en CE. Tanto a nivel basal como después de 4 años de seguimiento, la subpoblación de células T CD8+ con mayor contribución a la respuesta total fue MIP1 β +TNF α -IL2- (64% [59] vs. 49% [57] para Gag; y 53% [60] vs. 57% [73] para Nef, respectivamente), mientras que la contribución del resto de subpoblaciones fue mínima. Sin embargo, se produjo un incremento en la polifuncionalidad de las células T CD8+ específicas del VIH-1 al cabo de 4 años de seguimiento, debido principalmente a la subpoblación MIP1 β +TNF α +IL2- (0% [7] vs. 10% [21], $p=0,043$ para Gag; y 0% [0] vs. 6% [14]; $p=0,138$ para Nef). También se observó un aumento en la contribución de MIP1 β -TNF α +IL2- tanto para Gag como para Nef (0% [29] vs. 9% [14], $p=0,917$; y 0% [51] vs. 19% [29], $p=0,345$, respectivamente). Además, se observa que en 3 pacientes aparece la subpoblación de células T CD8+ específicas de Gag que producen MIP1 β , TNF α e IL2 ([Figura 11](#)).

Como cabía esperar, para ambas especificidades, la molécula con mayor contribución a la respuesta total a nivel basal fue MIP1 β . Sin embargo, aunque las subpoblaciones MIP1 β + se mantuvieron como las más contribuyentes después de 4 años (83% [59] vs. 87% [29] para Gag; y 69% [51] vs. 71% [71] para Nef), la contribución de las subpoblaciones TNF α + aumentó (9% [30] vs. 42% [31], $p=0,176$ para Gag; y 0% [51] vs. 26% [43], $p=0,463$ para Nef; [Figura 14](#)).

A nivel basal, la respuesta total frente a Gag y Nef estuvo restringida a las células T CD8+ monofuncionales. Sin embargo, después de 4 años de seguimiento, las subpoblaciones monofuncionales tendieron a disminuir (100% [12] vs. 79% [42], $p=0,048$ para Gag; y 100% (16) vs. 87% (15), $p=0,051$ para Nef), mientras que las subpoblaciones con dos funciones aumentaron (0% vs. 11% [21], $p=0,043$ para Gag; y 0% vs. 9% (14), $p=0,046$ para Nef). Estas subpoblaciones bifuncionales estuvieron principalmente representadas por las subpoblaciones MIP1 β +TNF α +

No se encontraron diferencias significativas cuando el perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ específicas de Gag se comparó con el de la respuesta de células T CD8+ específicas de Nef, tanto a nivel basal como después de 4 años. Por último, se observó una correlación positiva entre la variación de la contribución de MIP1 β +TNF α +IL2- a la respuesta frente a Nef con la variación de la cifra de CD4+ ($R= 0,930$; $p=0,007$; [Figura 15](#)).

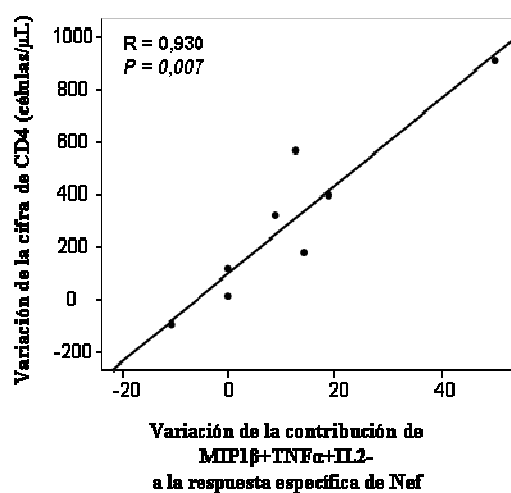


Figura 15. Correlación positiva entre la variación de la cifra de CD4+ con la variación de la contribución de la subpoblación MIP1β+TNFα+IL2- a la respuesta total frente a Nef observada en CE.

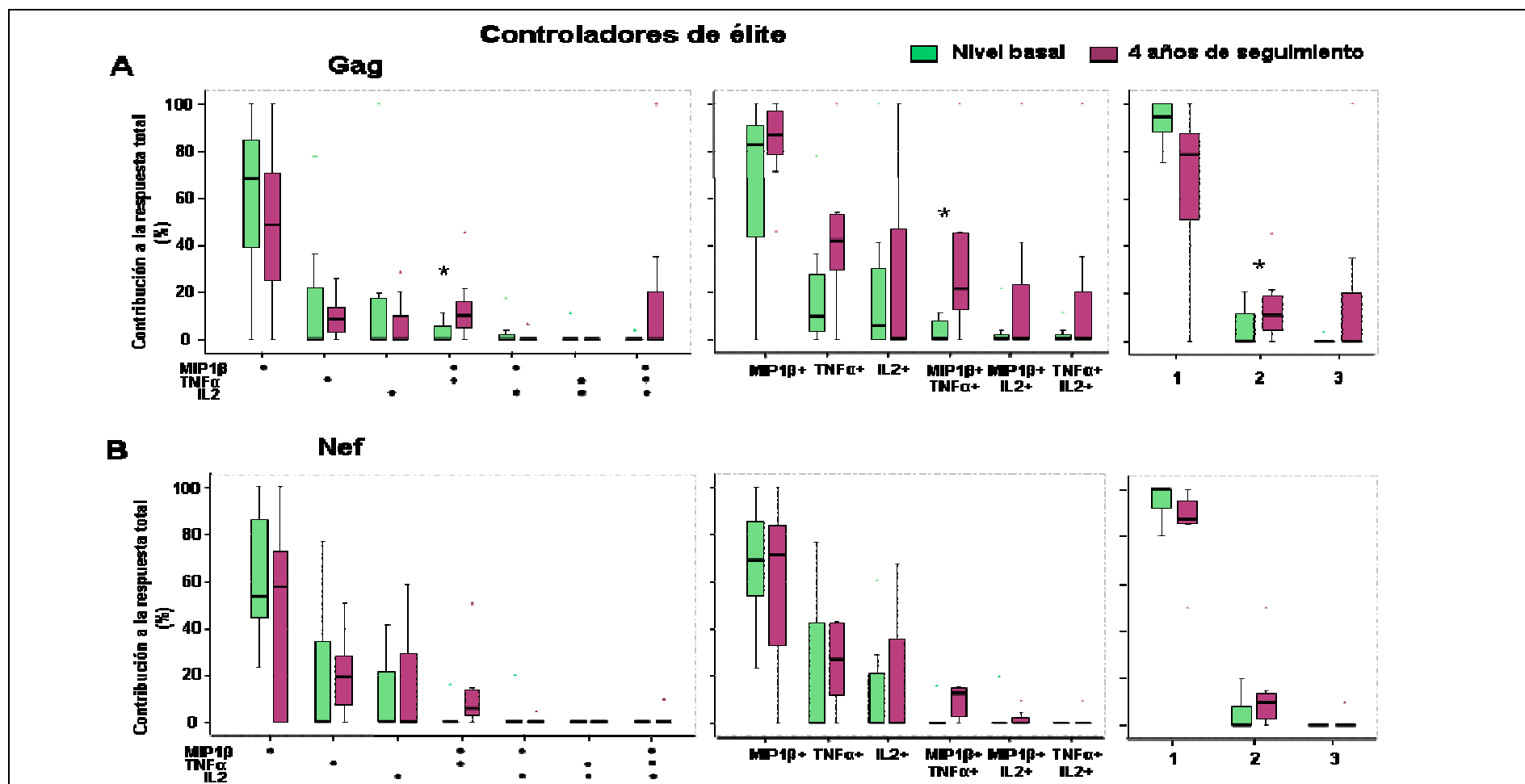


Figura 14. Evolución del perfil funcional de las células T CD8⁺ en controladores de élite. Las gráficas muestran la contribución a la respuesta total frente a Gag (A) y Nef (B) de las 7 subpoblaciones funcionales excluyentes (gráficas izquierda), de las distintas subpoblaciones de acuerdo a la producción de 1 ó 2 moléculas (gráficas centro) y de las subpoblaciones según el número de funciones (gráficas derecha). * $P < 0,05$.

1.5. Evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en progresores tratados con supresión de la viremia

Casi el 100% de los sujetos PTARV presentaron niveles detectables de respuesta de células T CD8+ específicas de Gag tanto a nivel basal como después de 4 años de seguimiento. La respuesta frente a Nef fue detectable en el 90% de los pacientes a nivel basal y en el 70% de los pacientes al cabo de los 4 años. Los niveles de la respuesta total para ambas especificidades se mantuvieron durante el seguimiento (0,54% [2,07] vs. 0,35% [0,46]; [Figura 9.A.](#) para Gag; y 0,30% [0,71] vs. 0,35% [1,08]; [Figura 9.B.](#) para Nef).

La [Figura 16](#) muestra la evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas de Gag y de Nef en individuos PTARV. A nivel basal, la subpoblación MIP1 β +TNF α -IL2- fue la que más contribuyó (58% [58] para Gag y 40% [67] para Nef), seguida por MIP1 β -TNF α +IL2- (8% [39] para Gag y 36% [97] para Nef). Después de 4 años de seguimiento, la contribución de la subpoblación MIP1 β +TNF α -IL2- tendió a aumentar aunque las diferencias no fueron significativas (74% [56] para Gag y 80% [80] para Nef después de los 4 años de seguimiento), mientras que la contribución de MIP1 β -TNF α +IL2- tendió a disminuir para Nef (36% [97] vs. 0% [80], $p=0,063$). Además, en la [Figura 11](#), se observa en 3 pacientes la pérdida de polifuncionalidad de la respuesta de células T CD8+ específicas de Gag.

La contribución de las subpoblaciones MIP1 β + tendió a aumentar después de 4 años (75% [39] vs. 100% [34], $p=0,050$ para Gag; y 40% [100] vs. 100% [80], $p=0,052$ para Nef; [Figura 16](#)). La contribución de las subpoblaciones TNF α + se mantuvo para Gag (18% [61] vs. 13% [52]),

mientras que para Nef tendió a disminuir (52% [73] vs. 20% [80], $p=0,060$). Además, la respuesta total frente a Gag y Nef estuvo restringida a las células T CD8+ con una función en ambos momentos del estudio (96% [22] vs. 100% [50] para Gag; y 100% [32] vs. 100% [17] para Nef).

Cuando se comparó el perfil funcional basal de las respuestas específicas de Gag y de Nef, la contribución de las subpoblaciones MIP1 β + para Gag fue significativamente mayor que para Nef (75% [39] vs. 40% [100], $p=0,018$). Sin embargo, la contribución de las subpoblaciones TNF α + fue significativamente mayor en respuesta a Nef que a Gag (52% [73] vs. 18% [61], $p=0,012$). No hubo diferencias significativas entre ambas especificidades al cabo de 4 años de seguimiento. Por último, no se observó ninguna asociación entre ambos perfiles funcionales de las respuestas específicas de Gag y de Nef y la cifra de CD4+, tanto a nivel basal como después de 4 años de TARV.

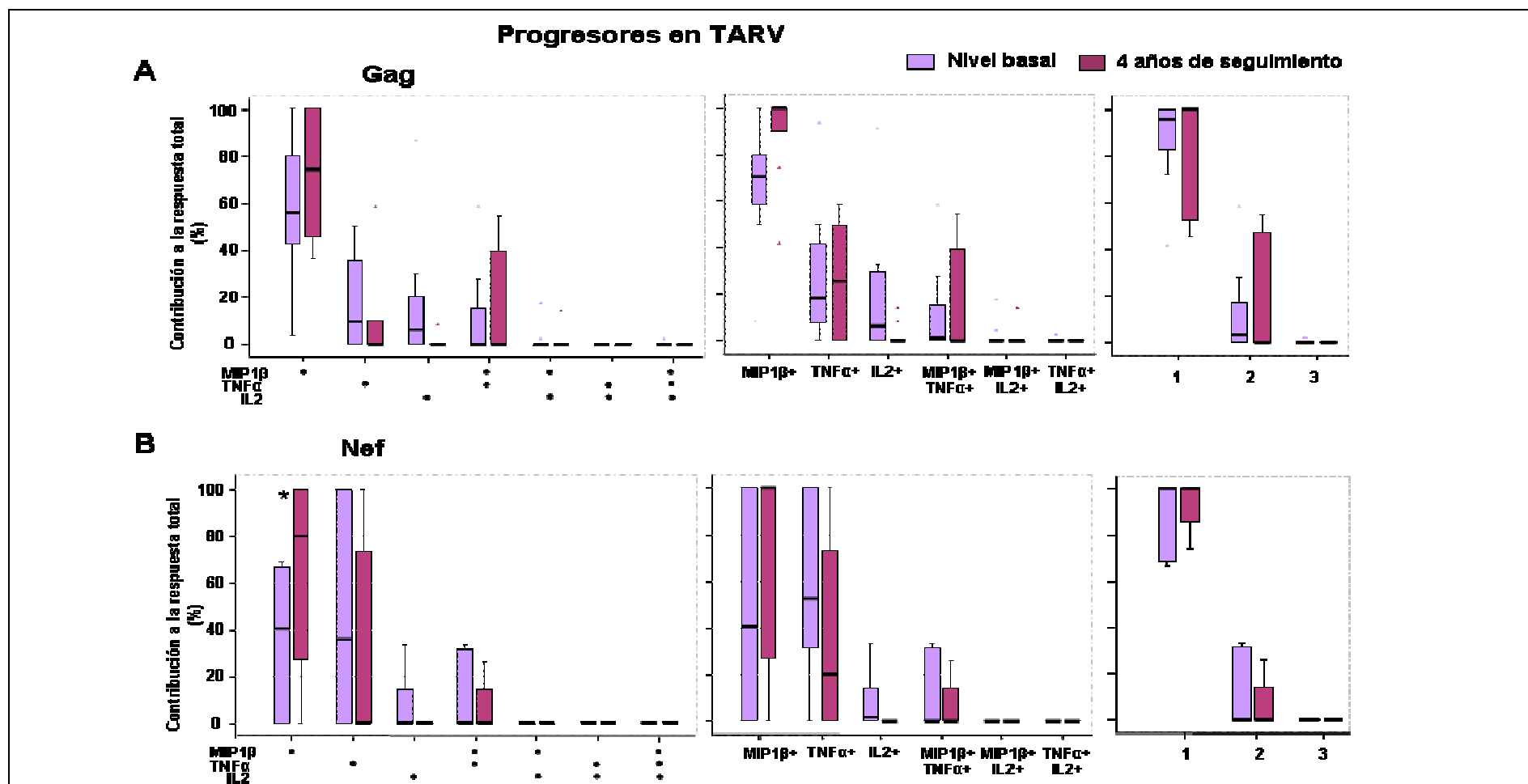


Figura 16. Evolución del perfil funcional de las células T CD8⁺ en progresores típicos bajo TARV. Las gráficas muestran la contribución a la respuesta total frente a Gag (A) y Nef (B) de las 7 subpoblaciones funcionales excluyentes (gráficas izquierda), de las distintas subpoblaciones de acuerdo a la producción de 1 ó 2 moléculas (gráficas centro) y de las subpoblaciones según el número de funciones (gráficas derecha). * $P < 0,05$

2. Efecto del TARV sobre la calidad de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1

Después de observar que los PTARV mantuvieron una respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1 monofuncional durante 4 años de seguimiento, se planteó un estudio para analizar la influencia de la supresión de la carga viral con TARV sobre las cualidades de la respuesta. Para ello se analizó un grupo de pacientes en los que disponíamos de muestra basal antes de iniciar TARV y de muestras de seguimiento tras el inicio del TARV a corto plazo (1 año) y a largo plazo (5 años).

2.1. Población de estudio

Un total de 36 individuos con infección crónica del VIH-1 fueron seguidos al iniciar TARV durante 1 año (a corto plazo). Todos los pacientes alcanzaron viremia plasmática indetectable en los 3 primeros meses de TARV. También se produjo un aumento significativo de la cifra de CD4 ([Tabla 5](#)). Se analizó la respuesta y la capacidad de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1. Se continuó el seguimiento en 10 de estos pacientes durante 5 años (a largo plazo) que mantuvieron carga viral indetectable y también mostraron un aumento significativo de la cifra de CD4+ respecto al momento basal y después de un año de TARV. Por falta de muestras, no se pudo analizar la capacidad de expansión en los pacientes con seguimiento a 5 años.

Tabla 5. Características inmunológicas y virológicas de los pacientes.

	N	Cifra de CD4 (células/ μ l)	Carga viral (log ₁₀ copias/ml)
Basal (pre-TARV)	36	379 [235]	4,57 [0,79]
1 año en TARV	36	477 [346] ^a	1,69 [0] ^c
5 años en TARV	10	707 [426] ^b	1,69 [0] ^c

Los datos se muestran como mediana y [amplitud intercuartílica].

^a Es significativo cuando se compara con la cifra de CD4 basal ($p < 0,001$)

^b Es significativo cuando se compara con la cifra de CD4 basal ($p < 0,001$) y con la de 1 año en TARV ($p = 0,006$).

^c Es significativo cuando se compara con la carga viral basal (ambos con $p < 0,001$)

2.2. La prevalencia de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1 no cambió significativamente al suprimir la viremia con TARV

Antes de iniciar TARV, más del 90% de los pacientes presentaron respuesta detectable de células T CD8+ específicas de Gag y de Nef. No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1 en los distintos tiempos de seguimiento analizados (97% para Gag y 86% para Nef, después de 1 año de TARV; 77% para ambas especificidades, después de 5 años de TARV).

A nivel basal, las subpoblaciones de células T CD8+ específicas de Gag con mayor prevalencia fueron MIP1 β +TNF α -IL2- (83%), seguidas por MIP1 β -TNF α +IL2- y por MIP1 β +TNF α +IL2- (ambas 57%). No se observó ningún cambio significativo en estas prevalencias al cabo de 1 año y 5 años de TARV ([Figura 17](#)). MIP1 β fue la molécula más prevalente durante todo el seguimiento, seguido por TNF α y, por último, por IL2 (86%, 80% y 71% para MIP1 β ; 74%, 57% y 41% para TNF α ; y 40%, 66% y 39% para IL2, respectivamente a nivel basal, 1 año y 5 años de TARV).

En cuanto a Nef, la subpoblación con mayor prevalencia a nivel basal fue MIP1 β +TNF α -IL2- (69%), seguida por MIP1 β -TNF α +IL2-, MIP1 β -TNF α -IL2+ y MIP1 β +TNF α +IL2- (37% en cada una de estas subpoblaciones). Tampoco hubo diferencias significativas a lo largo del seguimiento bajo TARV (Figura 17). Las moléculas más prevalentes en la respuesta frente a Nef fueron MIP1 β y TNF α a nivel basal y después de 1 y 5 años de TARV (69%, 57% y 53% para MIP1 β ; y 60%, 66% y 41% para TNF α , respectivamente).

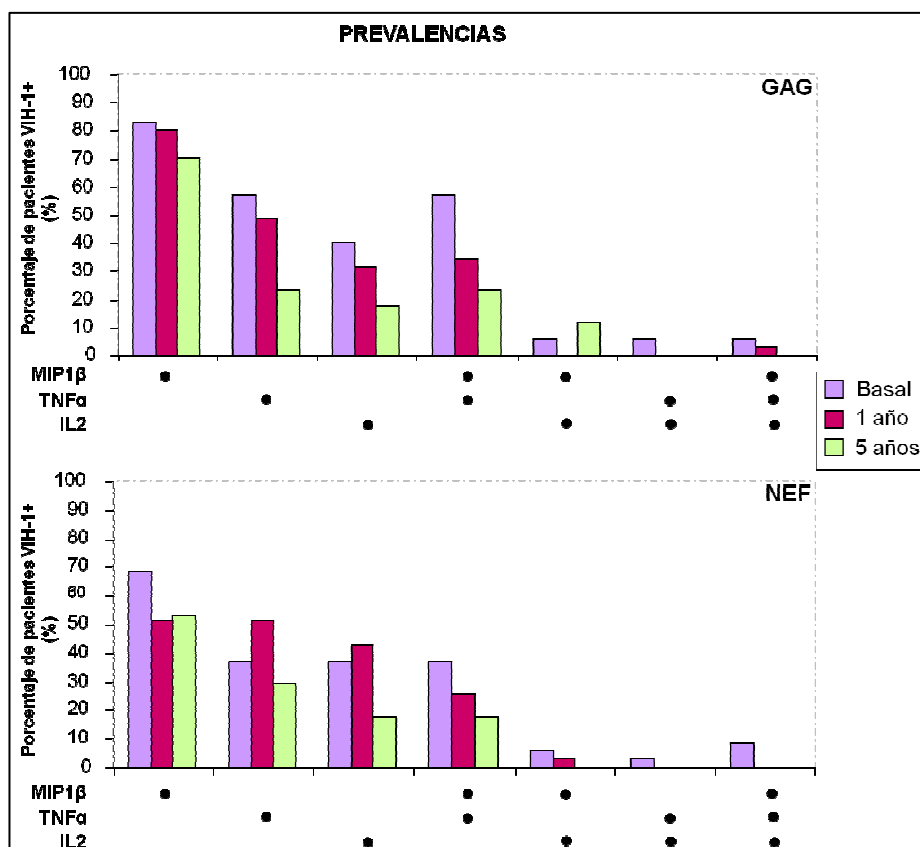


Figura 17. Prevalencia de la respuesta de las 7 subpoblaciones funcionales excluyentes frente a Gag (arriba) y Nef (abajo) en los progresores típicos antes (a nivel basal) y después de 1 año y 5 años de iniciar TARV.

2.3. La supresión de la viremia plasmática en pacientes bajo TARV modificó el perfil cuantitativo pero no el perfil cualitativo de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1

La respuesta total de células T CD8+ específicas de Gag disminuyó significativamente al cabo de 1 año de TARV respecto al momento basal (0,80% [1,89] vs. 0,41% [0,78], $p=0,004$ para el nivel basal y 1 año respectivamente; [Figura 18](#)). Después de 5 años de TARV, esta respuesta seguía disminuida comparada con la del nivel basal (0,80% [1,89] vs. 0,19% [0,38], $p=0,002$ a el nivel basal y 5 años respectivamente; [Figura 18](#)).

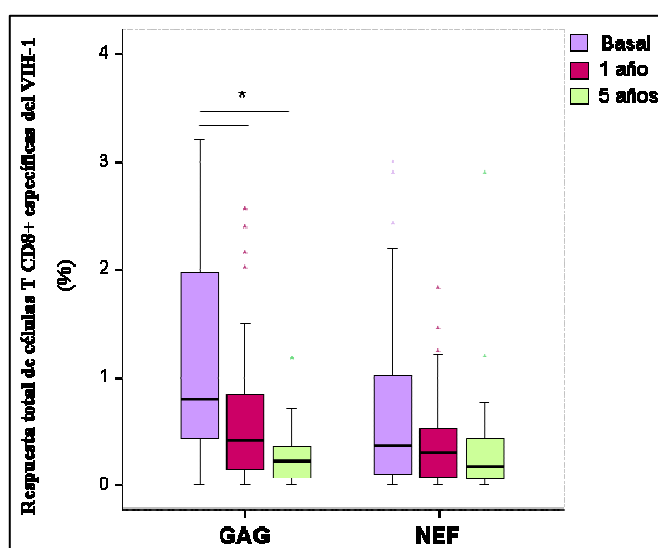


Figura 18. Nivel de respuesta total de células T CD8+ específicas de Gag y de Nef a nivel basal, después de 1 año y 5 años de TARV. * $P<0,05$

A nivel basal, la subpoblación de células T CD8+ con mayor contribución a la respuesta total frente a Gag fue MIP1 β +TNF α -IL2- (68% [64]), seguida por MIP1 β -TNF α +IL2- y MIP1 β +TNF α +IL2- (8% [37] y 4% [15], respectivamente). MIP1 β fue la molécula que más contribuyó a la

respuesta total (85% [66]), seguida de $\text{TNF}\alpha$ (21% [45]). Las subpoblaciones de células T CD8+ monofuncionales fueron las que más contribuyeron a la respuesta total frente a Gag (95% [19]), seguidas de las subpoblaciones bifuncionales (5% [19]). La supresión de la replicación viral después de 1 año de TARV no modificó significativamente las contribuciones de las subpoblaciones T CD8+ Gag-específicas ([Figura 19](#)). Interesantemente, esta supresión virológica durante un periodo de 5 años tampoco cambió significativamente el perfil funcional de la respuesta T CD8+ Gag-específicas, dado que $\text{MIP1}\beta+\text{TNF}\alpha\text{-IL2-}$ seguía siendo la subpoblación que más contribuyó a la respuesta total (71% [57]) y, además, casi todas las subpoblaciones de células T CD8+ que contribuyeron fueron monofuncionales (100 [44]).

No se encontraron diferencias significativas en la respuesta total de células T CD8+ específicas de Nef a nivel basal y después de 1 año de TARV (0,37% [0,93] vs. 0,30% [0,48], $p=0,079$ respectivamente; [Figura 18](#)). Sin embargo, al cabo de 5 años de TARV, se observó un menor nivel de esta respuesta respecto al nivel basal, aunque no alcanzó diferencia estadística (0,37% [0,93] vs. 0,14% [0,48], $p=0,087$ a nivel basal y tras 5 años de tratamiento, respectivamente; [Figura 18](#)). Al igual que para la respuesta específica de Gag, $\text{MIP1}\beta+\text{TNF}\alpha\text{-IL2-}$ fue la subpoblación con mayor contribución a la respuesta total frente a Nef antes del inicio del TARV (47% [86]), mientras que la contribución del resto de subpoblaciones fue mínima ([Figura 19.A](#)). Al cabo de 1 año de TARV, se observó una disminución significativa en las contribuciones de las subpoblaciones $\text{MIP1}\beta+\text{TNF}\alpha\text{-IL2-}$ y $\text{MIP1}\beta+$ (47% [86] vs. 14% [67], $p=0,008$; y 65% [93] vs.

21% [100], $p=0,002$, para el nivel basal y tras 1 año de tratamiento, respectivamente). Sin embargo, 5 años después de supresión virológica bajo TARV, no se modificó el perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ Nef-específica, dado que MIP1 β +TNF α -IL2- seguía siendo la subpoblación con mayor contribución a la respuesta total (49% [100]), mientras que la contribución del resto de subpoblaciones fue mínima. Finalmente, a lo largo de todo el seguimiento, casi todas las subpoblaciones fueron monofuncionales (100% [19], 100% [24] y 100% [7], a nivel basal, al cabo de 1 año y 5 años de viremia indetectable bajo TARV, respectivamente; [Figura 19.B.](#)), predominando siempre las subpoblaciones productoras de MIP1 β .

2.4. Comparación del perfil funcional de las respuestas de células T CD8+ según su especificidad a lo largo del seguimiento

A nivel basal, no se observó ninguna diferencia significativa tras comparar el perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ específicas de Gag con el de la respuesta de células T CD8+ específicas de Nef. Sin embargo, después de 1 año de TARV, se observó una mayor contribución de MIP1 β +TNF α -IL2- en la respuesta a Gag (50% [84] vs. 14% [67], $p=0,002$, para Gag y Nef, respectivamente) y una mayor contribución de MIP1 β -TNF α +IL2- en la respuesta a Nef (25% [68] vs. 4% [48], $p=0,027$, para Nef y Gag, respectivamente). Además, el nivel de respuesta total de células T CD8+ específicas de Gag fue mayor que el observado frente a Nef (0,41% [0,78] vs. 0,3% [0,48], $p=0,009$). No obstante, estas diferencias en el perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ específicas de Gag y de Nef observadas al año de TARV, no se mantuvieron tras 5 años de

supresión virológica con TARV, exceptuando el hecho de que la contribución de MIP1 β + fue mayor en respuesta a Gag respecto a Nef (87% [28] vs. 56% [100], $p=0,034$, para Gag y Nef, respectivamente).

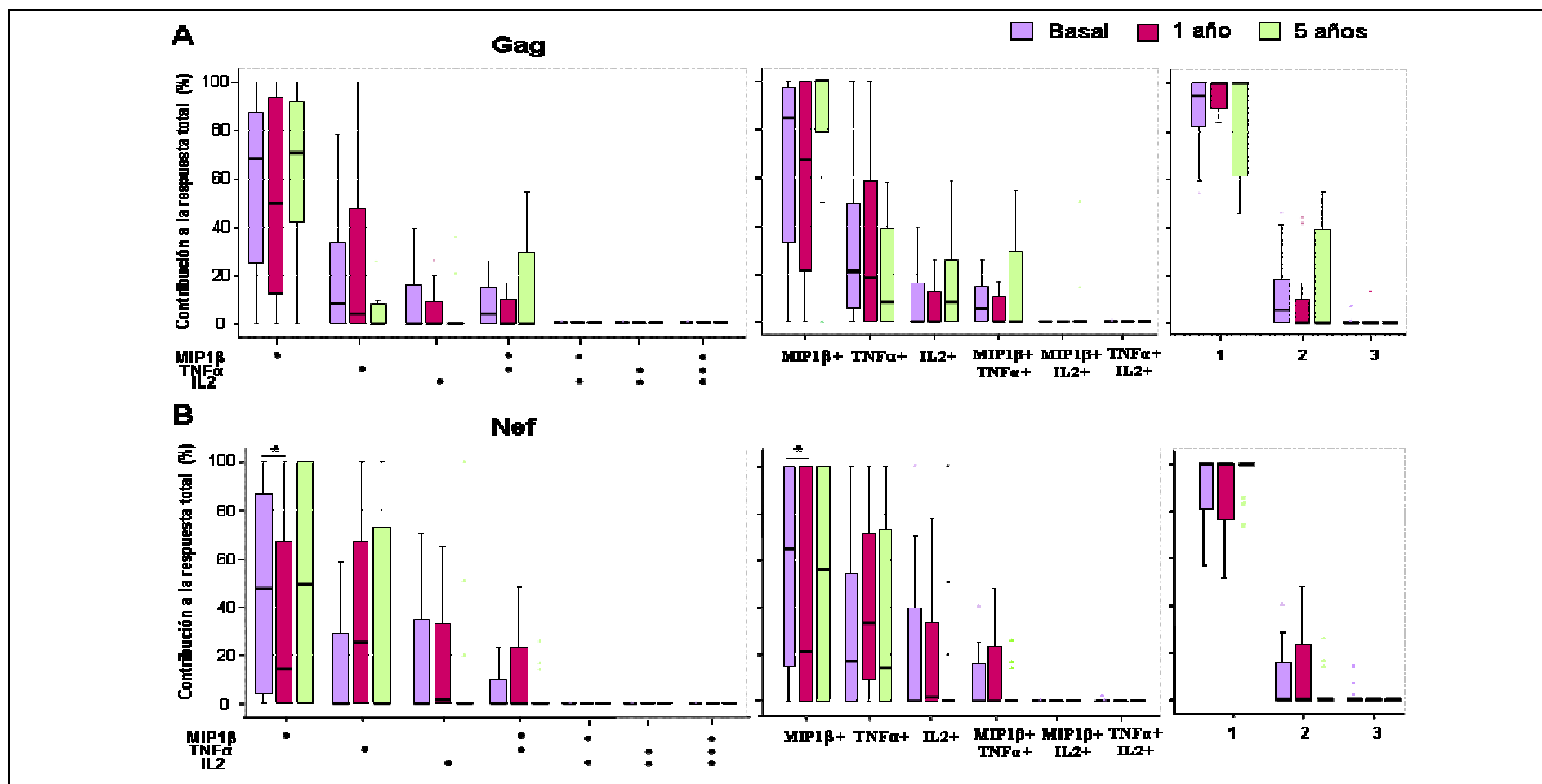


Figura 19. Representación de la contribución a la respuesta total de células T CD8 $^+$ frente a Gag (**A**) y Nef (**B**) de las principales subpoblaciones funcionales excluyentes (gráficas izquierda), de las distintas subpoblaciones de acuerdo a la producción de 1 ó 2 moléculas (gráficas centro) y de las subpoblaciones según el número de funciones (gráficas derecha) en los distintos tiempos de seguimiento: a nivel basal (pre-TARV), después de 1 año y 5 años de TARV. * $P < 0,05$.

2.5. La prevalencia de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1 no cambió al suprimir la viremia con TARV

Se analizó la prevalencia de expansión de las células T CD8+ específicas de Gag y de Nef tanto a nivel basal como después de 1 año de viremia indetectable con TARV (Figura 20). El nivel de expansión positiva fue definido como aquel con una ratio mayor o igual a 3. A nivel basal, las subpoblaciones con mayor prevalencia de expansión fueron MIP1 β +TNF α -IL2- y MIP1 β +TNF α +IL2- tanto las específicas frente a Gag como frente a Nef (ambas con un 36% de prevalencia para Gag; y 28% y 48% respectivamente para Nef). Tras 1 año de supresión virológica con TARV, no hubo ninguna diferencia en la prevalencia de expansión de las células T CD8+ VIH-1-específicas.

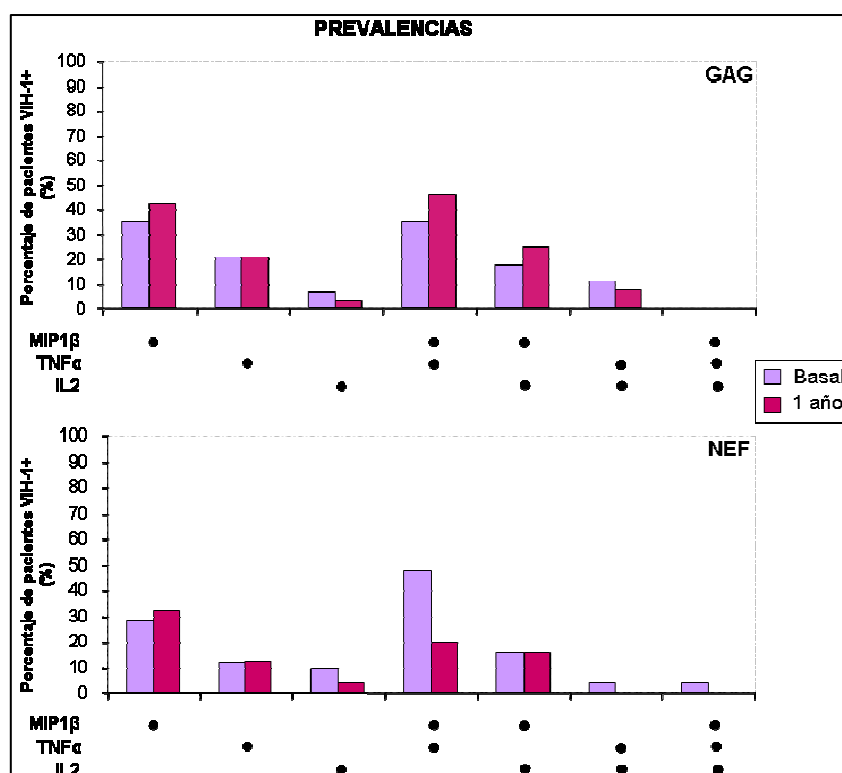


Figura 20. Porcentaje de pacientes VIH-1+ con capacidad de expansión detectable frente a Gag y Nef a nivel basal y después 1 año de TARV con viremia suprimida.

2.6. El nivel de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1 no se modificó después de 1 año de TARV

La capacidad de expansión total de las células T CD8+ Gag-específicas a nivel basal fue de 2,06 [1,75] y no cambió al cabo de 1 año de TARV (2,24 [2,54]; [Figura 21](#)). Tampoco se observó un cambio en la capacidad de expansión total de las células T CD8+ específicas de Nef después de 1 año de supresión virológica con TARV (1,87 [1,15] vs. 1,87 [2,17], a nivel basal y después de 1 año, respectivamente; [Figura 21](#)).

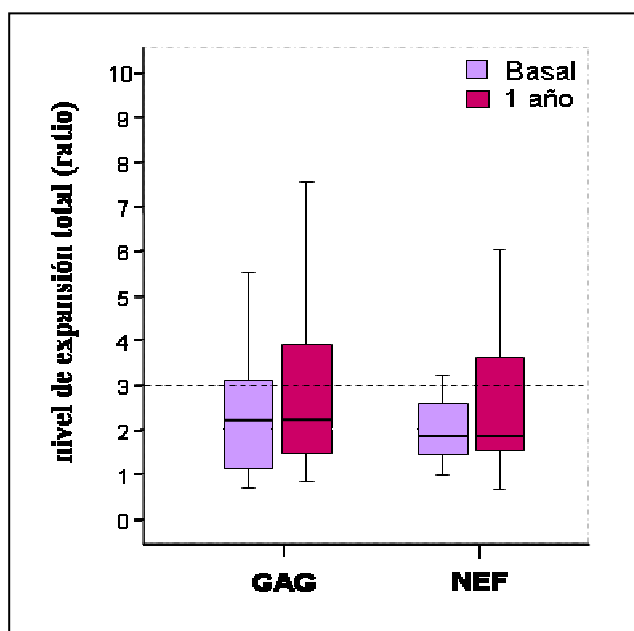


Figura 21. Nivel de expansión total (ratio) de las células T CD8+ específicas de Gag y Nef en pacientes que inician TARV, a nivel basal y tras un año de TARV con carga viral suprimida. La línea discontinua marca el punto de corte para considerar una expansión positiva.

Cuando se analizó la capacidad de expansión de cada una de las subpoblaciones funcionales excluyentes a nivel basal, se observó que, para ninguna de las 7 subpoblaciones, la mediana de expansión superó el valor de corte de 3 ([Figura 22](#)). Al cabo de 1 año de supresión de la viremia

plasmática inducida con TARV, las subpoblaciones MIP1 β +TNF α +IL2- y MIP1 β + específicas de Gag mostraron una mediana de expansión ligeramente por encima del punto de corte (3,02 [6,01] y 3,07 [5,33], respectivamente), aunque la diferencia con respecto a la basal no fue estadísticamente significativa ($p=0,329$ y $p=0,227$, respectivamente; [Figura 22](#)). Por tanto, los pacientes progresores típicos con viremia indetectable inducida por el TARV durante 1 año no mostraron un aumento en la expansión de las subpoblaciones T CD8+ específicas de Gag ni de Nef. Finalmente, no se encontró ninguna asociación entre la capacidad de expansión de las subpoblaciones de células T CD8+ específicas de Gag y de Nef con la cifra de CD4+ ni con la carga viral.

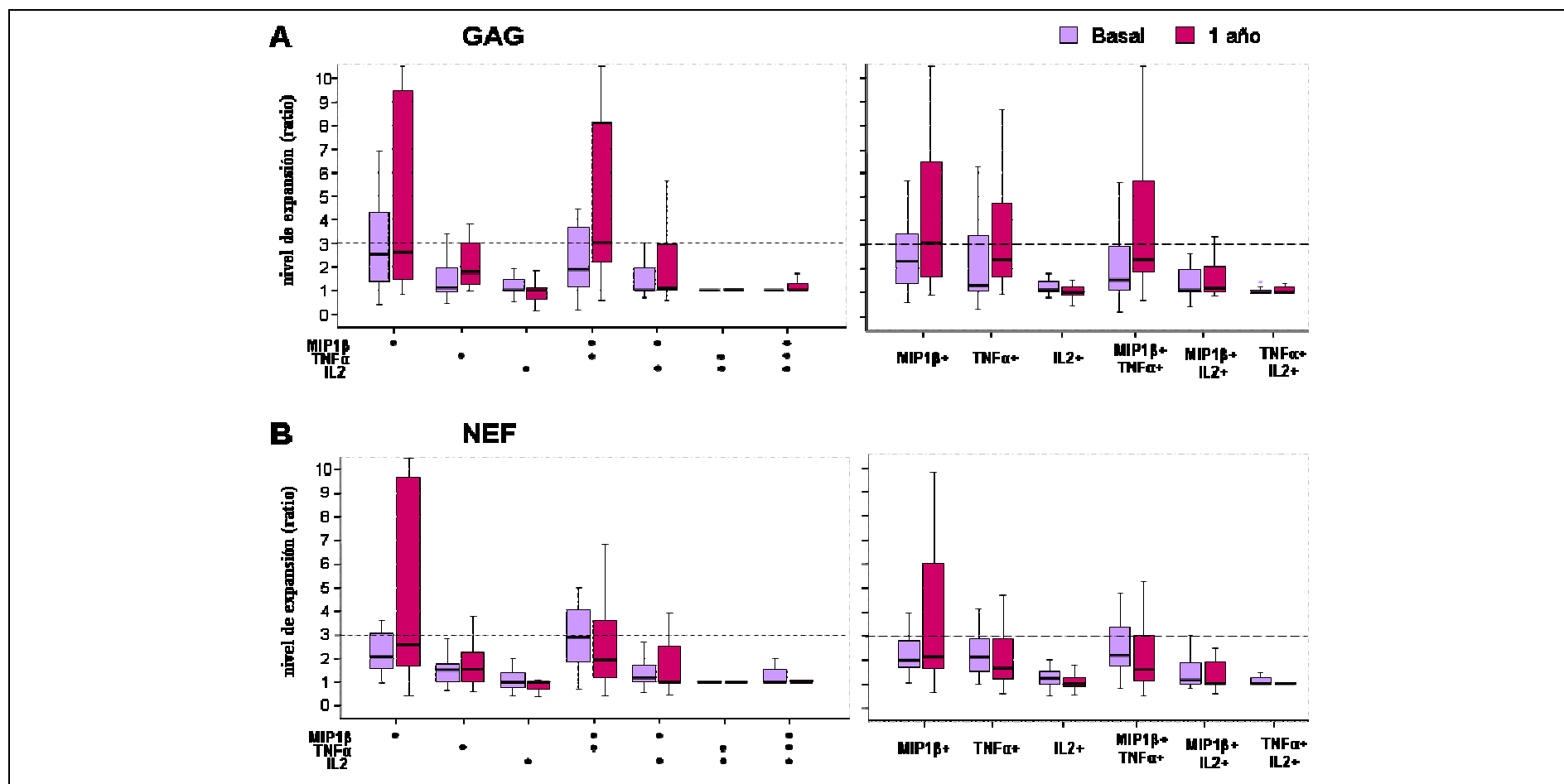


Figura 22. Representación del nivel de expansión de las 7 subpoblaciones de células T CD8+ funcionales excluyentes (gráfica izquierda) y de las subpoblaciones que producen 1 y 2 moléculas (gráfica derecha) tras ser estimulados con péptidos de Gag (**A**) y péptidos de Nef (**B**) antes y después de 1 año de TARV. La línea discontinua marca el punto de corte para considerar una expansión positiva.

3. Estudio del efecto de la interrupción del TARV sobre la respuesta y la capacidad de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1

Nuestros resultados anteriores han mostrado que aunque los pacientes CE (que controlan la replicación del VIH-1 espontáneamente) presentan una evolución de la respuesta específica de células T CD8+ hacia una mayor polifuncionalidad, la supresión de la viremia con TARV no parece influir en la calidad de la respuesta de células T CD8+. El siguiente objetivo fue verificar si la replicación viral, como consecuencia de la interrupción del TARV tras un periodo prolongado de supresión viral, es capaz de modular las características de la respuesta de las células T CD8+ VIH-1-específicas.

3.1. Población de estudio

Se analizaron un total de 9 individuos con infección crónica por el VIH-1. Antes de iniciar el TARV, la mediana de la carga viral fue de 4,34 [0,77] log copias/ml, la mediana del recuento de CD4 fue de 420 [262] células/ μ l y la mediana del tiempo de infección fue de 13 [9] años. Después de estar en TARV durante más de 5 años (mediana: 6 [8] años) y mostrando repetidamente más de 500 células CD4/ μ l y carga viral indetectable, el TARV fue interrumpido por petición del paciente. Después de 1 año de interrupción del TARV, todos los pacientes sufrieron un rebrote viral con una mediana de carga viral de 4,35 [0,77] log copias/ml ($p=0,018$) y una disminución significativa de la cifra de CD4 (646 [378] vs. 420 [262],

$p=0,018$). Todos los pacientes reiniciaron TARV al cabo de 1 año (mediana: 1 [2] años), consiguiendo de nuevo una viremia plasmática indetectable y una cifra de CD4+ por encima de 500 células/ μ l. En este estudio, se analizó la respuesta y la capacidad de expansión de las células T CD8+ estimuladas con péptidos óptimos de Gag y de Nef antes de la interrupción de TARV cuando la viremia era indetectable (basal) y tras 1 año de interrupción de TARV cuando la viremia era detectable.

3.2. La prevalencia de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1 no cambió en pacientes que interrumpieron el TARV

Más del 65% de los pacientes tenían respuesta T CD8+ específica de Gag detectable a nivel basal y en más del 75% era detectable frente a Nef. El porcentaje de pacientes con respuesta detectable frente a Gag aumentó al 89% tras la interrupción del TARV, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La prevalencia de respuesta total frente a Nef no varió tras interrumpir el TARV.

La [Figura 23](#) muestra la prevalencia de respuesta frente a Gag y Nef antes y después de la interrupción del TARV. La subpoblación con mayor prevalencia de respuesta frente a Gag y Nef fue MIP1 β +TNF α -IL2- tanto a nivel basal (56% y 67%, respectivamente) como después de 1 año de interrupción del TARV (89% y 67%, respectivamente). No hubo cambios significativos en los niveles de prevalencia de las subpoblaciones de células T CD8+ específicas de Gag y de Nef tras la interrupción del TARV.

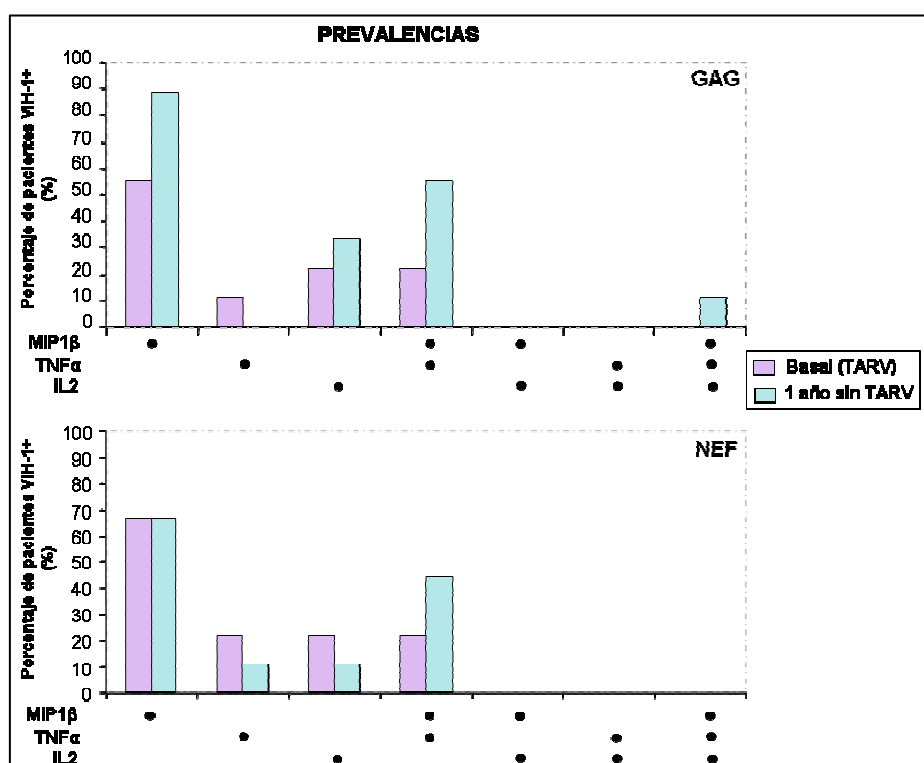


Figura 23. Porcentaje de pacientes VIH-1+ con respuesta detectable frente a Gag (arriba) y Nef (abajo) a nivel basal (en TARV) y después 1 año de interrupción del TARV.

3.3. El incremento de viremia tras la interrupción del TARV modificó el perfil cuantitativo pero no el perfil cualitativo de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1

El nivel de respuesta específica del VIH-1 aumentó al cabo de 1 año de interrupción del TARV (0,12 [0,19] vs. 0,29 [0,87], $p=0,024$ para Gag; y 0,10 [0,25] vs. 0,18 [0,86], $p=0,017$ para Nef; [Figura 24](#)).

MIP1β+TNFα-IL2- fue la subpoblación que más contribuyó a la respuesta de células T CD8+ Gag-específicas a nivel basal y durante todo el seguimiento (50% [78] vs. 62% [31], $p=0,686$), mientras que la contribución del resto de subpoblaciones fue mínima ([Figura 25.A.](#)). MIP1β fue la molécula que más contribuyó a la respuesta total durante todo el

seguimiento, seguida por TNF α (100% [46] vs. 100% [27], $p=0,293$ para MIP1 β ; y 19% [46] vs. 29% [28], $p=0,345$ para TNF α , a nivel basal y después de 1 año de interrupción del TARV, respectivamente). La respuesta total Gag-específica estuvo restringida a las subpoblaciones monofuncionales (100% [46]) y no se observaron cambios significativos tras 1 año de interrupción del TARV (71% [35], $p=1,000$; [Figura 25.A](#)).

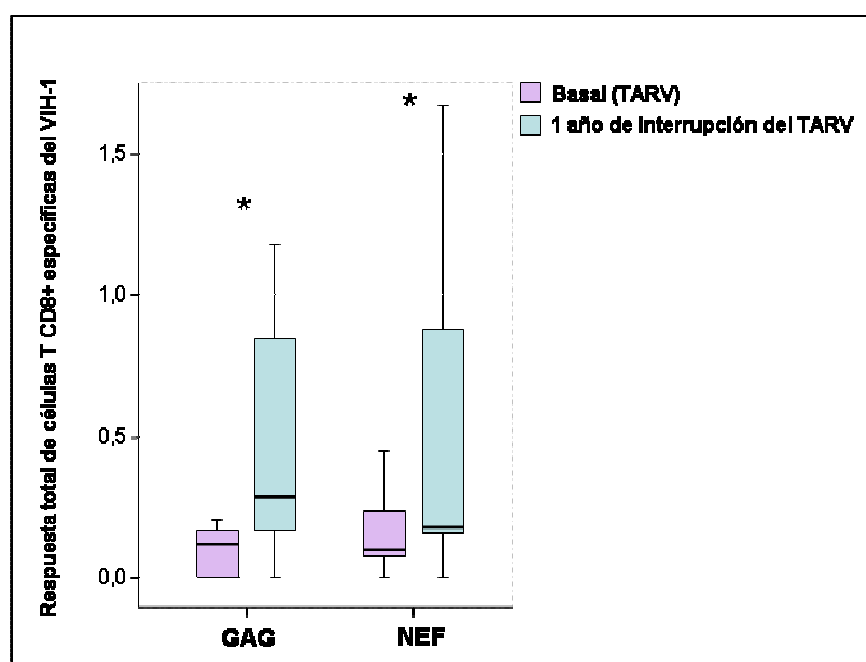


Figura 24. Nivel de respuesta total de células T CD8+ específicas de Gag y de Nef a nivel basal y después de 1 año de interrupción del TARV. * $P<0,05$

Respecto a Nef, se encontró que MIP1 β +TNF α -IL2- fue también la subpoblación que más contribuyó a nivel basal (67% [50]) y no varió significativamente después de 1 año de interrupción del TARV (82% [38]; [Figura 25.B](#)). Asimismo, la contribución de las subpoblaciones que producían MIP1 β no cambió significativamente al cabo de 1 año sin TARV (73% [50] vs. 100% [6], a nivel basal y después de 1 año de interrupción del TARV, respectivamente; [Figura 25.B](#)), como tampoco las contribuciones del resto

de subpoblaciones. La respuesta total Nef-específica estuvo también restringida a las subpoblaciones monofuncionales durante todo el seguimiento.

Por otro parte, no se observó ninguna diferencia significativa al comparar el perfil funcional de la respuesta total de las células T CD8+ Gag-específicas con el de las Nef-específicas ni a nivel basal ni después de la interrupción del TARV. Finalmente, tampoco se observó ninguna correlación entre la cifra de CD4 o la carga viral con las contribuciones de las diferentes subpoblaciones de las células T CD8+ específicas de Gag y de Nef en los dos momentos analizados.

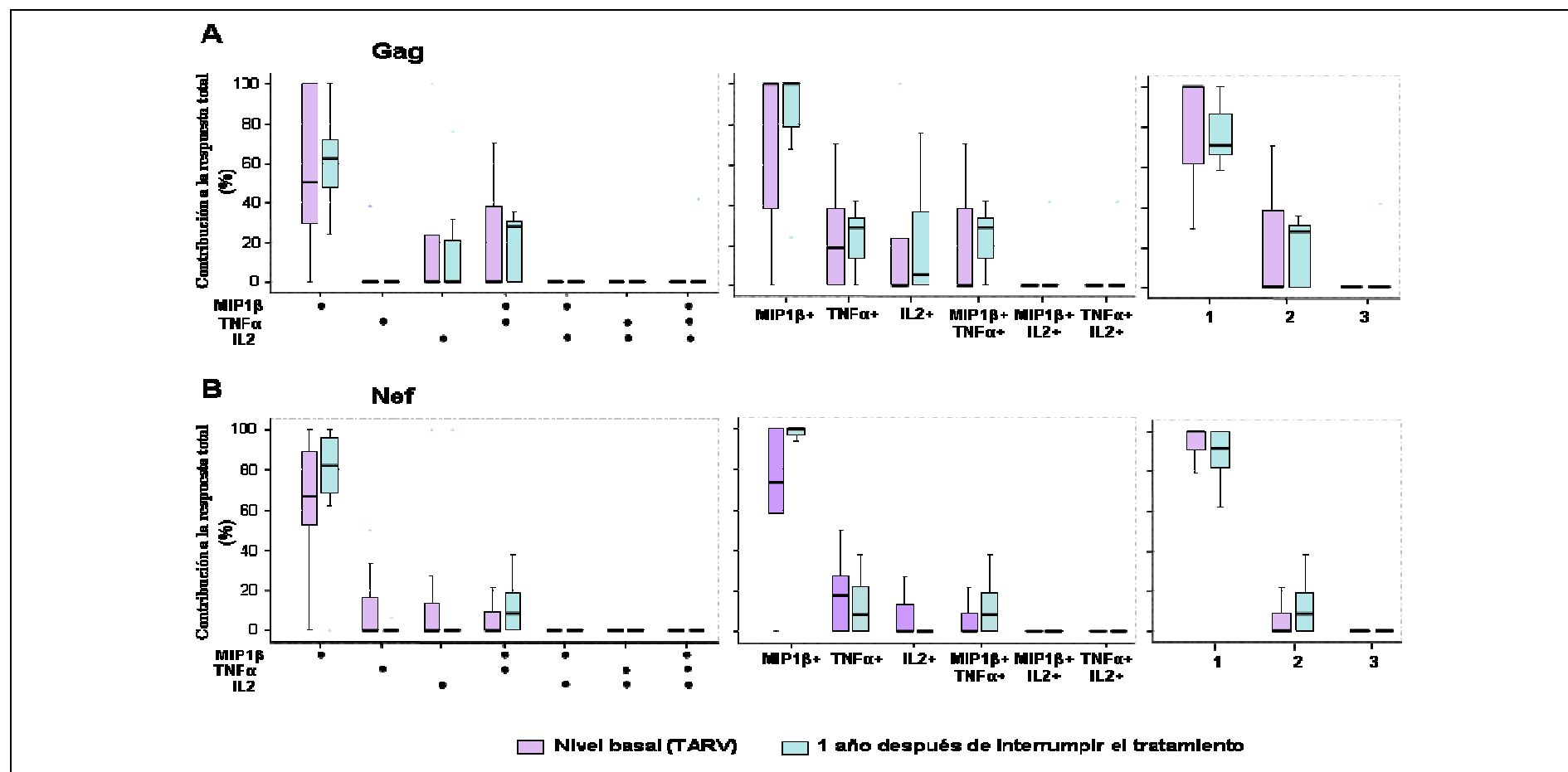


Figura 25. Evolución del perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ en pacientes progresores típicos antes y después de interrumpir el TARV. Las gráficas muestran la contribución a la respuesta total frente a Gag (A) y Nef (B) de las 7 subpoblaciones funcional excluyentes (gráficas izquierda), de las diferentes subpoblaciones que producen 1 y 2 moléculas (gráficas centro) y de las subpoblaciones según el número de funciones (gráficas derecha).

3.4. La prevalencia de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1 no cambió en pacientes que interrumpieron el TARV

Se analizó la prevalencia de expansión de las células T CD8+ específicas de Gag y de Nef tanto a nivel basal como después de 1 año de interrupción del TARV ([Figura 26](#)). Un nivel de expansión positiva se definió como aquel con una ratio mayor o igual a 3. A nivel basal, la subpoblación con mayor prevalencia de expansión fue MIP1 β +TNF α +IL2- (33%), seguida por MIP1 β +TNF α -IL2- (22%) y MIP1 β +TNF α -IL2+ (11%) para Gag y MIP1 β +TNF α -IL2- (33%), seguida por MIP1 β +TNF α +IL2- (22%) y MIP1 β +TNF α -IL2+ (11%) para Nef.

Tras 1 año de interrupción del TARV, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de pacientes que presentaban expansión de células T CD8+ específicas del Gag y Nef. Para Gag, ningún paciente presentó células MIP1 β +TNF α +IL2- y MIP1 β +TNF α -IL2+ capaces de expandirse y sólo un 11% de pacientes presentó expansión de la subpoblación MIP1 β +TNF α -IL2-. Aunque el 33% de los pacientes mantuvieron la capacidad de expansión de las células MIP1 β +TNF α +IL2- específicas de Nef después de 1 año sin TARV, ningún paciente presentó células MIP1 β +TNF α +IL2- capaces de expandirse. Sin embargo, el 22% de los pacientes presentaron células MIP1 β +TNF α -IL2+ capaces de expandirse.

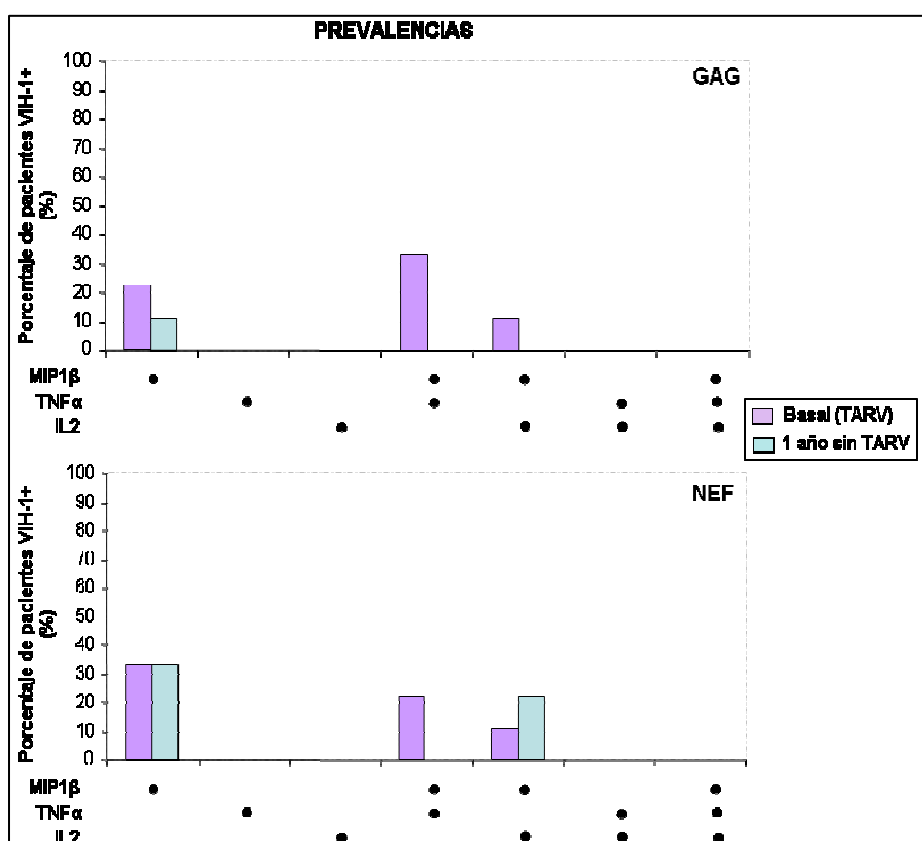


Figura 26. Porcentaje de pacientes VIH-1+ con capacidad de expansión detectable frente a Gag y Nef antes y después 1 año de la interrupción del TARV.

3.5. El nivel de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1 no cambió en los pacientes que interrumpieron el TARV

La mediana del nivel de expansión total frente al VIH-1 no superó el punto de corte de 3 ni antes ni después de interrumpir el TARV tanto para Gag (1,12 [1,09] vs. 1,15 [0,56], respectivamente) como para Nef (1,16 [1,02] vs. 1,74 [1,13], respectivamente; [Figura 27](#)).

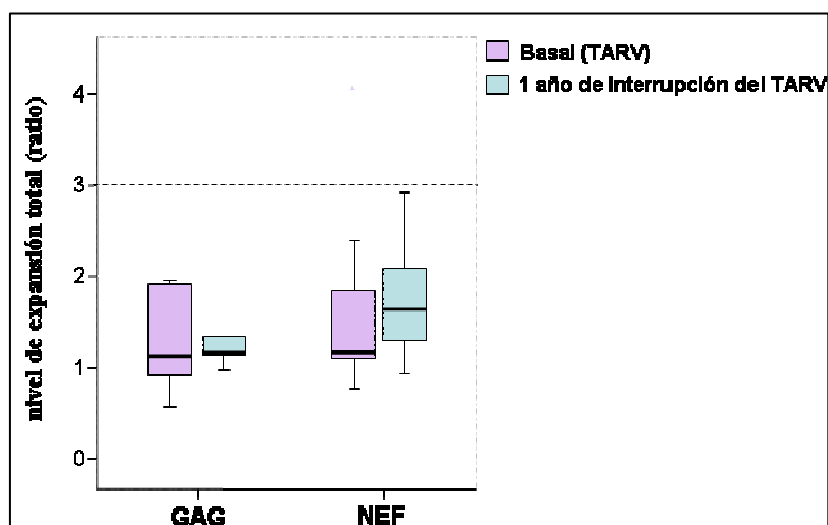


Figura 27. Nivel de expansión total (ratio) de las células T CD8+ específicas de Gag y de Nef a nivel basal (TARV) y después de 1 año de interrupción del TARV. La línea discontinua marca el punto de corte para considerar una expansión positiva.

El análisis del nivel de expansión de las distintas subpoblaciones de células T CD8+ específicas del VIH-1 mostró que la mediana de expansión para estas subpoblaciones funcionales no superó el nivel de 3 en ninguno de los dos puntos analizados, tanto para las células específicas de Gag como de Nef (**Figura 28**). Por último, tampoco se observó ninguna correlación entre la cifra de CD4+ o la carga viral y el nivel de expansión de las diferentes subpoblaciones de células T CD8+ específicas de Gag y de Nef.

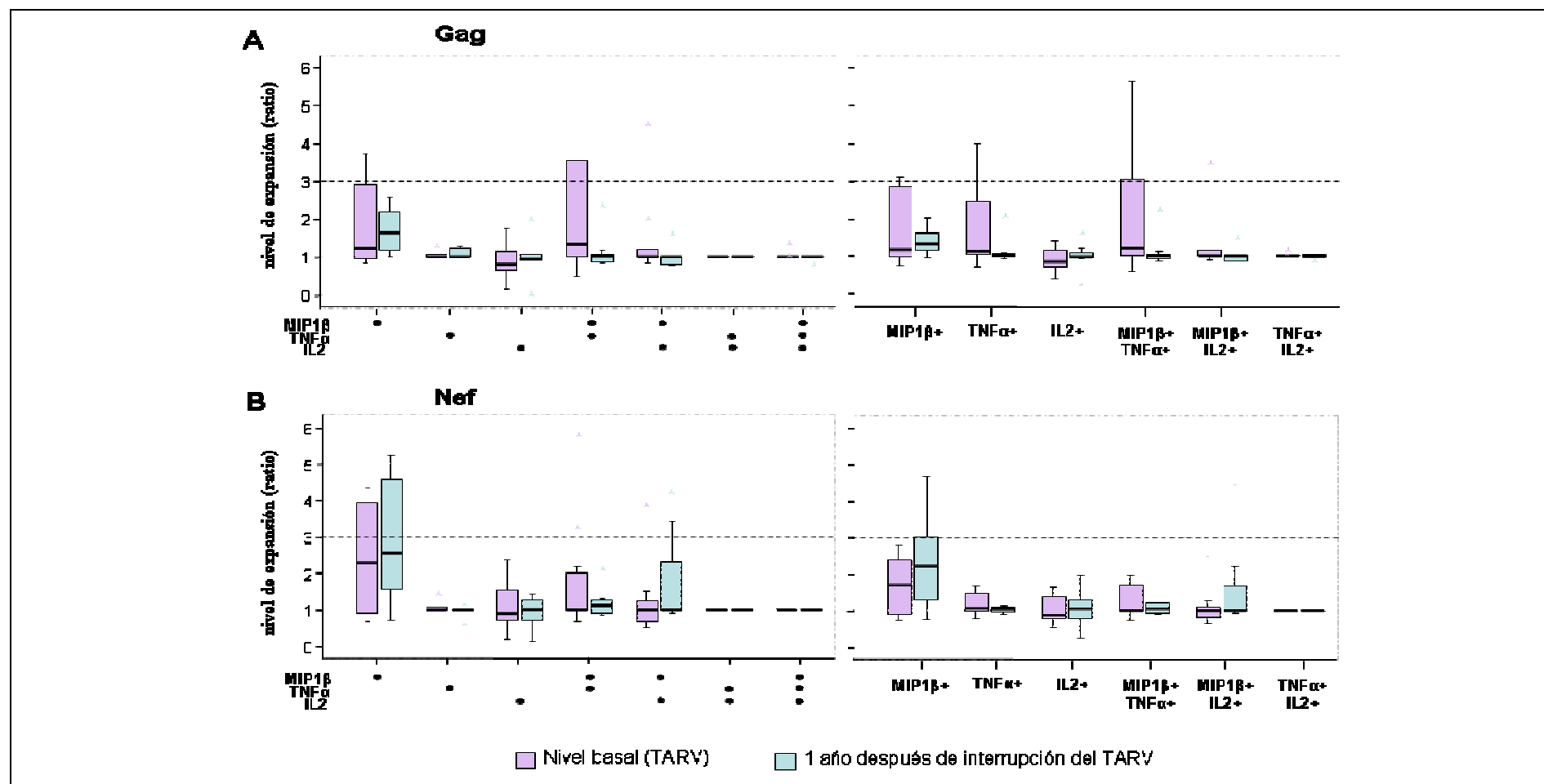


Figura 28. Representación del nivel de expansión de las 7 subpoblaciones de células T CD8+ funcional excluyentes (gráficas izquierda) y de las subpoblaciones que producen 1 y 2 moléculas (gráficas derecha) tras ser estimulados con péptidos de Gag (A) o péptidos de Nef (B) antes y después de 1 año de interrumpir el TARV. La línea discontinua marca el punto de corte para considerar una expansión positiva.

DISCUSIÓN

La respuesta inmune adaptativa interviene en la protección frente a infecciones virales. El efecto antiviral de la inmunidad humoral es crítico para prevenir la infección viral, mientras que la inmunidad celular es fundamental en el control de la infección crónica (312). El VIH-1 pertenece a la clase de virus que persisten y establecen una infección crónica, tal como CMV, EBV, VHC y VHB (312-314). Un gran número de estudios apoyan el papel protector de la respuesta de células T específicas del VIH-1 en el control de la replicación viral y en la prevención de la progresión a SIDA (34,35,37,164-167). Aunque cierto perfil funcional de la respuesta de células T CD4+ específicas del VIH-1 se ha correlacionado con un control más efectivo de la replicación viral tras la infección primaria (290), parece ser que el papel protector recae con mayor peso en la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1 (35,36,150,163,166,179-186,188,315). Sin embargo, el fracaso de la vacuna de Merck frente al VIH-1 basada en la inducción de una respuesta inmune de células T CD8+ antígeno-específica (316), ha dado lugar a una re-evaluación de los conocimientos a nivel básico sobre las características determinantes de una respuesta inmune celular eficaz. Por tanto, estudios como éste son necesarios para intentar dilucidar los mecanismos y factores determinantes del control espontáneo de la replicación viral observado en pacientes "controladores" de la infección por este virus.

Entre todas las características de la respuesta de las células T CD8+ específicas del VIH-1, la calidad parece ser un factor importante en el control espontáneo de la replicación del VIH-1 (171,186,305-308). La mayoría de los estudios que analizan las asociaciones entre la replicación viral y el nivel o el

perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ son transversales (171,186). Asumiendo que existe una interrelación entre la replicación del virus y las características de la respuesta de células T CD8+, es interesante conocer si existe evolución temporal de dicha respuesta en condiciones virológicas diversas, ya sean estables (supresión viral completa o replicación viral activa) o cambiantes (cambio de replicación viral activa a supresión viral completa o viceversa). En nuestro estudio, se examinó si se producía una evolución (y, si la hubo, cómo era) del perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ VIH-1-específicas después de 4 años de seguimiento en individuos VIH-1+ que experimentan una progresión divergente de la enfermedad VIH-1. En este estudio longitudinal, se incluyeron 4 grupos de pacientes: CE, quienes suprimen la viremia espontáneamente; PTARV, quienes suprimieron la viremia bajo TARV; CV, quienes tienen una viremia detectable a bajo nivel pero con una buena cifra de CD4+ en ausencia de TARV; y PT, quienes tienen una alta viremia plasmática y experimentan una pérdida significativa de la cifra de CD4+. A nuestro entender, éste es el primer estudio longitudinal que demuestra que hay una evolución diferente en la funcionalidad de las células T CD8+ específicas del VIH-1 según la progresión de la enfermedad VIH-1. Se observaron cambios significativos en el perfil funcional de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en pacientes PT. La desaparición de la subpoblación MIP1 β +IL2+ y de las subpoblaciones con 3 funciones al cabo de 4 años redujo la funcionalidad de las células T CD8+ específicas de Gag. Este mismo hallazgo también se ha observado en la infección aguda/primaria del VIH-1 (317), en el que las células T CD8+ de los pacientes no tratados tendían a ser monofuncionales a lo largo del

tiempo. Un defecto en los gránulos líticos (242) podría explicar una reducida efectividad de estas células en los sujetos PT. Además, las células T CD8+ específicas de Gag son un componente fundamental de una respuesta T CD8+ eficaz (283). Por tanto, una disminución en la contribución de las subpoblaciones T CD8+ específicas de Gag bifuncionales observada en PT, sugiere una pérdida gradual de la eficacia de esta respuesta inmune antígeno-específica. Paralelamente a esta disminución en la funcionalidad de la respuesta, la viremia aumentó significativamente durante el seguimiento en estos pacientes.

La respuesta de células T CD4+ cooperadora es necesaria para una respuesta de células T CD8+ eficaz (233,248,318). Las respuestas de células T CD4+ específicas de p24 (Gag) han sido particularmente asociadas con el control de la viremia (303,319). Aunque la funcionalidad de las células T CD4+ específicas del VIH-1 no se han examinado en nuestro estudio, la disminución significativa en la cifra de CD4+ observada en PT durante los 4 años de seguimiento podría resultar en la disminución paralela de la funcionalidad de la respuesta de células T CD8+ específica del VIH-1.

La evolución del perfil funcional de las células T CD8+ específicas de Gag y de Nef en el contexto de una viremia baja pero persistente se analizó en los CV. Se observó una evolución diferente en el perfil funcional de la respuesta T CD8+ según su especificidad. Para las respuestas de células T CD8+ específicas de Gag, se produjo un aumento en las subpoblaciones que producían IL2 con el tiempo. Las células que producen IL2 han sido asociadas con una respuesta eficaz de células T CD8+ frente al VIH-1 (320). Sin embargo, en la respuesta específica frente a Nef, tanto la subpoblación

bifuncional de células MIP1 β +TNF α +IL2- como la subpoblación MIP1 β -TNF α -IL2+ ser perdieron después de los 4 años de seguimiento. Estos resultados demuestran que hay una evolución diferencial según la especificidad, aunque hay una mejoría en la respuesta específica de Gag reflejada en la aparición de las células que producen IL2. Según un modelo previamente propuesto para explicar la interdependencia entre la viremia y la alteración funcional de las células T CD8+ antígeno-específicas (321), una evolución diferente del perfil funcional de las células T CD8+ observada en CV podría ser una consecuencia de la emergencia de mutaciones de escape que estarían modulando el nivel de los diferentes epítomos virales diana de las células T CD8+ (322).

Nuestros resultados más relevantes se observaron al examinar la evolución de las células T CD8+ específicas del VIH-1 en sujetos con viremia indetectable alcanzada bien espontáneamente (CE) o bien inducida por el TARV (PTARV). Si el perfil funcional de las células T CD8+ evoluciona de forma similar en estos 2 grupos, se podría sugerir que la supresión de la replicación del VIH-1 debería ser vista como la causa de las características de la respuesta de células T CD8+ específica del VIH-1. En pacientes CE, el perfil funcional de células T CD8+ específicas del VIH-1 mejoró significativamente después de 4 años de seguimiento, ya que se observó un aumento de la subpoblación MIP1 β +TNF α +IL2- para ambas especificidades. Sin embargo, en pacientes PTARV no se encontró un aumento en la funcionalidad de las células T CD8+ específicas del VIH-1. Por tanto, la polifuncionalidad en CE es posiblemente la causa más que la consecuencia del control de la replicación viral (186,305). Asimismo, la asociación entre el

aumento de la cifra de CD4 y el aumento de la contribución de la subpoblación MIP1 β +TNF α +IL2- a la respuesta total de las células T CD8+ frente a Nef en CE, sugiere que el mantenimiento de altos niveles de células T CD4+ puede ayudar a preservar o incrementar la polifuncionalidad de las respuestas T CD8+ específicas del VIH-1. Alternativamente, un aumento de la subpoblación MIP1 β +TNF α +IL2- podría indirectamente ayudar a mantener los altos niveles de células T CD4+ a través de su efecto en el control parcial de la replicación viral. En contraste con los CE, la monofuncionalidad predominó en las células T CD8+ VIH-1-específicas en los PTARV. A pesar del aumento significativo de la cifra de células T CD4+ y el mantenimiento de la viremia indetectable durante los 4 años de seguimiento, la funcionalidad de células T CD8+ VIH-1-específicas no aumentó en PTARV. El agotamiento clonal debido a una estimulación antigénica altamente persistente (317) antes del inicio del TARV podría explicar esta observación.

Otro aspecto importante que no está del claro es si el TARV afecta la relación causa-efecto entre la calidad de la respuesta de células T CD8+ y la replicación viral. Para abordar este tema, en nuestro estudio se analizó la evolución del perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ antes y después del inicio del TARV. Además, se analizó la evolución de la respuesta de células T CD8+ VIH-1-específicas a corto plazo (1 año) y a largo plazo (5 años) tras el inicio del TARV y la supresión virológica completa. La supresión completa de la replicación viral resulta en una disminución rápida de la frecuencia de células T específicas del VIH-1 circulantes (323), presumiblemente como consecuencia de una disminución del estímulo antigénico. En el contexto de una replicación viral

descontrolada, se ha sugerido que la disfunción afecta sólo a las células T CD8+ VIH-1-específicas, pero no a las células T CD8+ específicas frente a otros virus (230,233,310,324), por lo que los altos niveles de replicación del VIH-1 parecen afectar selectivamente a la respuesta anti-VIH-1. Asimismo, la replicación viral activa podría estar dañando la capacidad de expansión de las células T CD8+ VIH-1-específicas (171,184,185). Por tanto, el control de la replicación del VIH-1 inducida por el TARV podría influir positivamente en la funcionalidad de las células T CD8+ VIH-1-específicas (secreción de factores solubles y capacidad de expansión). Estudios previos (287,311,317) sugieren que la presencia del antígeno es la causa de la funcionalidad de las células T CD8+. Rehr *et al* (311) estudiaron longitudinalmente la capacidad de secreción de IFN γ , TNF α e IL2 por las células T CD8+ VIH-1-específicas en pacientes con infección crónica antes y después de 2 años de TARV. Sugirieron que la restauración de la polifuncionalidad de estas células T CD8+ es un proceso lento y que requiere una duración estimada de al menos 2 años y medio de éxito terapéutico (311). Streeck *et al* (317) realizaron un estudio longitudinal de la respuesta polifuncional (IFN γ , MIP1 β , TNF α , IL2 y CD107a) de las células T CD8+ VIH-1-específicas en progresores tratados durante 5 meses, observando que mantenían o aumentaban el porcentaje de las células T CD8+ con más de 1 función (317). Sin embargo, el significado de esta mejoría observada en la polifuncionalidad de las células T CD8+ VIH-1-específicas (311,317) no está del todo claro.

En nuestro estudio, la supresión viral completa después de 1 año bajo TARV en pacientes PT no produjo un aumento en la contribución de las

células T CD8⁺ Gag-específicas polifuncionales (MIP1 β +TNF α +IL2⁻, MIP1 β +TNF α -IL2⁺, MIP1 β -TNF α +IL2⁺ o MIP1 β +TNF α +IL2⁺), sino que se observó una disminución de la respuesta total de células T CD8⁺ Gag-específicas. En respuesta a Nef, la contribución de la subpoblación MIP1 β + disminuyó significativamente y se observó una tendencia a una mayor contribución de la subpoblación TNF α . El perfil funcional de la respuesta de células T CD8⁺ específica de Gag fue similar al perfil funcional específico de Nef a nivel basal, mientras que la contribución de MIP1 β +TNF α -IL2⁻ fue mayor en Gag que en Nef y la de MIP1 β -TNF α +IL2⁻ fue mayor en Nef que en Gag después de 1 año de TARV. Este resultado puede sugerir que exista un efecto diferencial de la supresión de la replicación viral en la contribución de determinadas subpoblaciones antígeno-específicas. No obstante, el perfil funcional no cambió al cabo de 1 año de TARV en cuanto a que la subpoblación con mayor contribución seguía siendo la subpoblación MIP1 β +TNF α -IL2⁻ para ambas especificidades. Se analizó también en estos pacientes la capacidad de expansión de las células T CD8⁺ VIH-1-específicas. No se observó una restauración significativa de la capacidad de expansión de las diferentes subpoblaciones de células T CD8⁺ específicas del VIH-1 al cabo de 1 de TARV. Además, al contrario que en otros estudios (325), no se encontró ninguna asociación entre la carga viral y la cifra de CD4⁺ con la capacidad de expansión de las células T CD8⁺ VIH-1-específicas. En conjunto, estos resultados sugieren que la supresión de la viremia plasmática durante este tiempo en TARV no modificó significativamente la calidad de la respuesta de células T CD8⁺ VIH-1-específica. Por tanto, los resultados de este estudio sugieren que la viremia

plasmática puede no ser la causa de las alteraciones observadas en las células T CD8+ VIH-1-específicas durante la infección crónica por VIH-1(310). Alternativamente, otra hipótesis coherente con los resultados de este estudio es que la replicación viral persistente antes del inicio del TARV podría inducir alteraciones irreversibles en la funcionalidad de la respuesta de células T CD8+ (321).

En base a nuestro estudio (310) y al de otros (287,311,317), puede ser necesario un tiempo más prologado de supresión viral completa con TARV para mostrar algún efecto significativo en la respuesta de células T CD8+. Para verificar esta hipótesis, se analizó el perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ VIH-1-específicas en aquellos pacientes que al cabo de 5 años de TARV continuaban con supresión de la replicación del VIH-1 y se comparó con el perfil funcional que presentaban a nivel basal (antes de que iniciaran TARV). Sin embargo, este análisis tampoco mostró ningún efecto positivo sobre la respuesta de células T CD8+ específica de Gag y de Nef, sino que únicamente se observó una disminución en el nivel de respuesta total de las células T CD8+ VIH-1-específicas (326). No hubo cambios en el perfil funcional debido a que MIP1 β +TNF α -IL2 seguía siendo la subpoblación con mayor contribución a la respuesta total después de 5 años de TARV. No se pudo evaluar la capacidad de expansión de las células T CD8+, debido a que no se disponía de muestra suficiente para evaluar en pacientes tratados durante 5 años. Al igual que después de 1 año de TARV, tampoco se observó ninguna asociación entre el perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ VIH-1-específicas y la carga viral o la cifra de CD4+. Por tanto, estos resultados apoyan la misma hipótesis que la obtenida

con el estudio a corto plazo con TARV y es que la supresión de la viremia plasmática bajo TARV no restablece la polifuncionalidad de las células T CD8+. Por tanto, estos resultados son coherentes con la hipótesis de que la calidad de la respuesta T CD8+ podría ser la causa del control de la replicación viral en aquellos pacientes que consiguen controlar al virus de forma espontánea (CE).

Otra forma de verificar las posibles interrelaciones entre la replicación viral y la calidad de la respuesta de las células T CD8+, sería observando la evolución de estos aspectos cualitativos de las células T CD8+ VIH-1-específicas en pacientes que interrumpen el TARV. Los pacientes seleccionados para este estudio mantuvieron la carga viral indetectable durante al menos 5 años antes de interrumpir el TARV. El análisis mostró que los pacientes sufrieron un rebrote de la carga viral al interrumpir el TARV. No hubo ningún cambio en el perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ VIH-1-específicas después de 1 año de interrupción del TARV, ya que MIP1 β +TNF α -IL2- seguía siendo la subpoblación que más contribuyó a la respuesta total. En cuanto al análisis de la capacidad de expansión de las células T CD8+ VIH-1-específicas, tampoco se observó expansión de ninguna subpoblación ni antes ni después de interrumpir el TARV. Estos resultados sugieren que el rebrote de la replicación viral podría ser el resultado de una función defectuosa de las células T CD8+ específicas del VIH-1, la cual no ha sido restaurada al suprimir la replicación viral bajo TARV ni a corto ni a largo plazo. Nuestros resultados coinciden con un estudio transversal (288), en el que analizaron la polifuncionalidad (IFN γ , MIP1 β , TNF α , IL2 y CD107a), la proliferación y la citotoxicidad de las células

T CD8+ VIH-1-específicas en pacientes con viremia suprimida bajo TARV durante 5 años y encontraron que estas características no eran restauradas por el TARV. Por otra parte, no puede descartarse que puedan existir defectos en estas funciones que persistieran incluso en presencia de una respuesta de células T CD4+ funcional y en presencia de IL2 exógena (288,327).

La relación causa-efecto entre la replicación del VIH-1 y la calidad de la respuesta de células T CD8+ durante la fase crónica de la infección parece ser más compleja de lo que se pensó en un principio. Aquellas funciones que parecen ser restauradas en pacientes tratados (311,317) podrían no estar implicadas en el control de la replicación viral, ya que los pacientes que interrumpieron el TARV sufrieron un rebrote de la carga viral (286,328,329) y no se observó un perfil polifuncional de la respuesta de células T CD8+ al nivel observado en los CE. Además, el impacto de la supresión de la replicación viral durante 5 años de TARV no aumentó la funcionalidad de las células T CD8+ VIH-1-específicas. En conjunto, estos resultados sugieren que las posibles alteraciones en la respuesta de células T CD8+ de los PT no son reversibles con el TARV a largo plazo durante la fase crónica de la infección por VIH-1. Sin embargo, la introducción temprana del TARV durante la fase aguda aumenta la expresión de CD127 en las células T CD8+ específicas del VIH-1 y restaura su capacidad proliferativa, alcanzando niveles similares a los observados en los CE (330). Además, recientemente se ha observado que los pacientes tratados durante la fase aguda y manteniendo viremia suprimida durante 9 años tienen una respuesta de células T específicas del VIH-1 similar a los LTNP (331). Sin

embargo, no se conoce aún si este beneficio perduraría tras interrumpir el TARV.

En resumen, nuestros resultados muestran que la evolución del perfil funcional de las subpoblaciones de células T CD8+ específicas del VIH-1 difiere en los sujetos infectados con progresión divergente de la enfermedad VIH-1. En PT, la polifuncionalidad de las células T CD8+ VIH-1-específicas disminuyó al cabo de 4 años de seguimiento, mientras que una respuesta monofuncional se mantuvo en CV y en PTARV. Sólo los CE mostraron un aumento en la funcionalidad de las células T CD8+ específicas del VIH-1. Una evolución diferente según la especificidad de las células T CD8+ apoya que las células T CD8+ específicas de Gag puedan ser cruciales en el control parcial de la replicación viral (283). En el estudio de los PT que iniciaron TARV, consiguiendo mantener una viremia indetectable durante 5 años, no se observó mejoría de la calidad de la respuesta frente al VIH-1, lo que sugiere que la supresión viral inducida por la terapia no es suficiente para restaurar la calidad de dicha respuesta. Esta hipótesis se ve apoyada con el estudio longitudinal de aquellos pacientes que interrumpieron el TARV en los que se observó que fueron incapaces de mantener el control de la replicación viral en ausencia de TARV e independientemente de la existencia de células T CD8+ específicas frente al VIH-1.

Entender cómo la polifuncionalidad de estas células se establece y se mantiene en la infección por VIH-1, podría ayudar a diseñar nuevas estrategias inmunomoduladoras y/o de vacunación encaminadas a inducir una respuesta de células T CD8+ efectiva. Por otra parte, estos resultados pueden tener un impacto terapéutico importante, dado que el beneficio del

TARV puede estar limitado a la supresión de la replicación viral y frenar el daño inmunológico, pero no a restaurar las respuestas inmunes que se encuentran alteradas o se han perdido, al menos en cuanto a las respuestas de las células T CD8+ específicas del VIH-1. Así pues, estrategias inmunomoduladoras adicionales pueden ser necesarias para aumentar y/o mejorar la eficacia de las respuestas inmunes específicas del VIH-1.

CONCLUSIONES

1. Existe una evolución temporal diferente del perfil funcional de la respuesta de células T CD8+ específicas del VIH-1 en los sujetos infectados con progresión divergente de la enfermedad VIH-1. La replicación viral alta y persistente se asoció con una disminución en la polifuncionalidad de las células T CD8+ específicas del VIH-1, mientras que el control espontáneo de la replicación en controladores de élite se asoció con un aumento en la polifuncionalidad de las células T CD8+ específicas del VIH-1.
2. Se produjo una evolución diferente del perfil funcional según la especificidad de las células T CD8+, lo que apoya que las células T CD8+ específicas de Gag puedan ser cruciales en el control parcial de la replicación viral.
3. La supresión virológica inducida por el TARV no restauró ni el perfil funcional de la respuesta ni la capacidad de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1 a corto plazo (1 año). Tampoco mejoró la calidad de la respuesta frente al VIH-1 tras 5 años de viremia indetectable.
4. La interrupción del TARV en pacientes que mantuvieron una viremia indetectable durante un periodo prolongado, produjo un rebrote de la viremia plasmática, mientras que no hubo ningún cambio en el perfil funcional de la respuesta ni en la capacidad de expansión de las células T CD8+ específicas del VIH-1.

BIBLIOGRAFÍA

1. Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 1991 Jul;5(10):2349-2360.
2. Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, et al. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front. Biosci.* 2004 Sep 1;9:2388-2413.
3. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 2009 Ago;15(8):871-872.
4. 20101123_GlobalReport_full_en.pdf (application/pdf Objeto) [Internet]. [citado 2011 May 23];Available from: http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en.pdf
5. Nisole S, Saïb A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology.* 2004;1:9.
6. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 1984 Ene 20;312(5996):763-767.
7. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 1998 Jun 18;393(6686):648-659.
8. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:657-700.
9. Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, et al. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003 Jul 11;1614(1):36-50.
10. Zhang H, Dornadula G, Orenstein J, Pomerantz RJ. Morphologic changes in human immunodeficiency virus type 1 virions secondary to intravirion reverse transcription: evidence indicating that reverse transcription may not take place within the intact viral core. *J. Hum. Virol.* 2000 Jun;3(3):165-172.
11. Peliska JA, Benkovic SJ. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science.* 1992 Nov 13;258(5085):1112-1118.
12. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science.* 1988 Nov 25;242(4882):1171-1173.
13. Hu WS, Temin HM. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science.* 1990 Nov 30;250(4985):1227-1233.
14. Farnet CM, Bushman FD. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell.* 1997 Feb 21;88(4):483-492.
15. Hindmarsh P, Leis J. Retroviral DNA integration. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999 Dic;63(4):836-843, table of contents.

16. Reines D, Conaway JW, Conaway RC. The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends Biochem. Sci.* 1996 Sep;21(9):351-355.
17. Conticello SG, Harris RS, Neuberger MS. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr. Biol.* 2003 Nov 11;13(22):2009-2013.
18. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* 2002 Ago 8;418(6898):646-650.
19. Niewiadomska AM, Yu X-F. Host restriction of HIV-1 by APOBEC3 and viral evasion through Vif. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009;339:1-25.
20. Courcoul M, Patience C, Rey F, Blanc D, Harmache A, Sire J, et al. Peripheral blood mononuclear cells produce normal amounts of defective Vif-human immunodeficiency virus type 1 particles which are restricted for the prerotranscription steps. *J. Virol.* 1995 Abr;69(4):2068-2074.
21. Sova P, van Ranst M, Gupta P, Balachandran R, Chao W, Itescu S, et al. Conservation of an intact human immunodeficiency virus type 1 vif gene in vitro and in vivo. *J. Virol.* 1995 Abr;69(4):2557-2564.
22. Atkins JF, Weiss RB, Gesteland RF. Ribosome gymnastics--degree of difficulty 9.5, style 10.0. *Cell.* 1990 Ago 10;62(3):413-423.
23. Brierley I. Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J. Gen. Virol.* 1995 Ago;76 (Pt 8):1885-1892.
24. Cullen BR. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem. Sci.* 2003 Ago;28(8):419-424.
25. Pincetic A, Leis J. The Mechanism of Budding of Retroviruses From Cell Membranes. *Adv Virol.* 2009 Ene 1;2009:6239691-6239699.
26. Ivanchenko S, Godinez WJ, Lampe M, Kräusslich H-G, Eils R, Rohr K, et al. Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog.* 2009 Nov;5(11):e1000652.
27. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. The structural biology of HIV assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008 Abr;18(2):203-217.
28. Sattentau QJ, Weiss RA. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell.* 1988 Mar 11;52(5):631-633.
29. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983 May 20;220(4599):868-871.
30. Gallo RC, Sliski A, Wong-Staal F. Origin of human T-cell leukaemia-lymphoma virus. *Lancet.* 1983 Oct 22;2(8356):962-963.
31. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 1998 Jul 2;339(1):33-39.

32. Henrard DR, Phillips JF, Muenz LR, Blattner WA, Wiesner D, Eyster ME, et al. Natural history of HIV-1 cell-free viremia. *JAMA*. 1995 Ago 16;274(7):554-558.
33. Kassutto S, Rosenberg ES. Primary HIV type 1 infection. *Clin. Infect. Dis*. 2004 May 15;38(10):1447-1453.
34. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol*. 1994 Sep;68(9):6103-6110.
35. Koup RA. Virus escape from CTL recognition. *J. Exp. Med*. 1994 Sep 1;180(3):779-782.
36. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*. 1998 Mar 27;279(5359):2103-2106.
37. Safrit JT, Andrews CA, Zhu T, Ho DD, Koup RA. Characterization of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte clones isolated during acute seroconversion: recognition of autologous virus sequences within a conserved immunodominant epitope. *J. Exp. Med*. 1994 Feb 1;179(2):463-472.
38. Shacklett BL, Cox CA, Quigley MF, Kreis C, Stollman NH, Jacobson MA, et al. Abundant expression of granzyme A, but not perforin, in granules of CD8+ T cells in GALT: implications for immune control of HIV-1 infection. *J. Immunol*. 2004 Jul 1;173(1):641-648.
39. Sacha JB, Chung C, Rakasz EG, Spencer SP, Jonas AK, Bean AT, et al. Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J. Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2746-2754.
40. Busch MP, Satten GA. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *Am. J. Med*. 1997 May 19;102(5B):117-124; discussion 125-126.
41. Katzenstein TL, Pedersen C, Nielsen C, Lundgren JD, Jakobsen PH, Gerstoft J. Longitudinal serum HIV RNA quantification: correlation to viral phenotype at seroconversion and clinical outcome. *AIDS*. 1996 Feb;10(2):167-173.
42. Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 1996 May 24;272(5265):1167-1170.
43. Bruisten SM, Frissen PH, Van Swieten P, Harrigan PR, Kinghorn I, Larder B, et al. Prospective longitudinal analysis of viral load and surrogate markers in relation to clinical progression in HIV type 1-infected persons. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1997 Mar 1;13(4):327-335.
44. Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann. Intern. Med*. 1998 Abr 15;128(8):613-620.

45. Mellors JW, Margolick JB, Phair JP, Rinaldo CR, Detels R, Jacobson LP, et al. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. *JAMA*. 2007 Jun 6;297(21):2349-2350.
46. Streeck H, Jolin JS, Qi Y, Yassine-Diab B, Johnson RC, Kwon DS, et al. Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4+ T cells. *J. Virol*. 2009 Ago;83(15):7641-7648.
47. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma Z-M, Rourke T, Wang Y, et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*. 2005 Abr 28;434(7037):1148-1152.
48. Douek DC. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS Rev*. 2003 Sep;5(3):172-177.
49. Weiss RA. Special anniversary review: twenty-five years of human immunodeficiency virus research: successes and challenges. *Clin. Exp. Immunol*. 2008 May;152(2):201-210.
50. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 1993 Ago;6(8):904-912.
51. Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hultin P, Schmid I, Matud JL, et al. Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up. *Cytometry*. 1996 Mar 15;26(1):1-7.
52. McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*. 2001 Abr 19;410(6831):974-979.
53. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RMM, Paul WE. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat. Med*. 2002 Abr;8(4):319-323.
54. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BHB, Roos MTL, Coutinho RA, Lange JMA, et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS*. 2003 Sep 5;17(13):1881-1888.
55. Deeks SG, Kitchen CMR, Liu L, Guo H, Gascon R, Narváez AB, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood*. 2004 Ago 15;104(4):942-947.
56. Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J. Immunol*. 1996 May 1;156(9):3509-3520.

57. Wang JK, Kiyokawa E, Verdin E, Trono D. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 Ene 4;97(1):394-399.
58. Simmons A, Aluvihare V, McMichael A. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity.* 2001 Jun;14(6):763-777.
59. Swingler S, Mann A, Jacqué J, Brichacek B, Sasseville VG, Williams K, et al. HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat. Med.* 1999 Sep;5(9):997-1003.
60. Lee C, Liu Q-H, Tomkowicz B, Yi Y, Freedman BD, Collman RG. Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. *J. Leukoc. Biol.* 2003 Nov;74(5):676-682.
61. Rieckmann P, Poli G, Fox CH, Kehrl JH, Fauci AS. Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. *J. Immunol.* 1991 Nov 1;147(9):2922-2927.
62. Doisne J-M, Urrutia A, Lacabartz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix M-L, et al. CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J. Immunol.* 2004 Ago 15;173(4):2410-2418.
63. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science.* 1998 Abr 17;280(5362):427-431.
64. Smith PD, Meng G, Salazar-Gonzalez JF, Shaw GM. Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *J. Leukoc. Biol.* 2003 Nov;74(5):642-649.
65. Choi YK, Whelton KM, Mlechick B, Murphey-Corb MA, Reinhart TA. Productive infection of dendritic cells by simian immunodeficiency virus in macaque intestinal tissues. *J. Pathol.* 2003 Dic;201(4):616-628.
66. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 2004 Sep 20;200(6):749-759.
67. Levesque MC, Moody MA, Hwang K-K, Marshall DJ, Whitesides JF, Amos JD, et al. Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS Med.* 2009 Jul 7;6(7):e1000107.
68. Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, et al. Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. *J. Virol.* 2008 Ene;82(1):538-545.

69. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 2006 Dic;12(12):1365-1371.
70. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann. Intern. Med.* 1996 Abr 1;124(7):654-663.
71. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 1998 Dic 17;396(6712):690-695.
72. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Kaplan AH, Detels R, Giorgi JV. CD8+ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1998 Ago 1;18(4):332-340.
73. Hazenberg MD, Hamann D, Schuitemaker H, Miedema F. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat. Immunol.* 2000 Oct;1(4):285-289.
74. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J. Pathol.* 2008 Ene;214(2):231-241.
75. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat. Med.* 1995 Feb;1(2):129-134.
76. Mohri H, Perelson AS, Tung K, Ribeiro RM, Ramratnam B, Markowitz M, et al. Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.* 2001 Nov 5;194(9):1277-1287.
77. Valdez H, Connick E, Smith KY, Lederman MM, Bosch RJ, Kim RS, et al. Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS.* 2002 Sep 27;16(14):1859-1866.
78. Tilling R, Kinloch S, Goh L-E, Cooper D, Perrin L, Lampe F, et al. Parallel decline of CD8+/CD38++ T cells and viraemia in response to quadruple highly active antiretroviral therapy in primary HIV infection. *AIDS.* 2002 Mar 8;16(4):589-596.
79. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 2003 May 15;187(10):1534-1543.
80. Benito JM, López M, Lozano S, Martínez P, González-Lahoz J, Soriano V. CD38 expression on CD8 T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2004 Feb;20(2):227-233.
81. Benito JM, López M, Lozano S, Ballesteros C, Martínez P, González-Lahoz J, et al. Differential upregulation of CD38 on different T-cell subsets may influence the ability to reconstitute CD4+ T cells under successful highly

- active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005 Abr 1;38(4):373-381.
82. Gougeon ML. T cell apoptosis as a consequence of chronic activation of the immune system in HIV infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995;374:121-127.
83. Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RP, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science.* 1992 Jul 10;257(5067):217-219.
84. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 1990 Abr 20;61(2):213-222.
85. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, et al. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science.* 1999 Nov 12;286(5443):1353-1357.
86. Pierson TC, Zhou Y, Kieffer TL, Ruff CT, Buck C, Siliciano RF. Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 2002 Sep;76(17):8518-8531.
87. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat. Med.* 1995 Dic;1(12):1284-1290.
88. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 Jul 21;95(15):8869-8873.
89. Chun T-W, Justement JS, Sanford C, Hallahan CW, Planta MA, Loutfy M, et al. Relationship between the frequency of HIV-specific CD8+ T cells and the level of CD38+CD8+ T cells in untreated HIV-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 Feb 24;101(8):2464-2469.
90. Smith BA, Gartner S, Liu Y, Perelson AS, Stilianakis NI, Keele BF, et al. Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J. Immunol.* 2001 Ene 1;166(1):690-696.
91. Keele BF, Tazi L, Gartner S, Liu Y, Burgon TB, Estes JD, et al. Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2008 Jun;82(11):5548-5561.
92. De Maria A, Pantaleo G, Schnittman SM, Greenhouse JJ, Baseler M, Orenstein JM, et al. Infection of CD8+ T lymphocytes with HIV. Requirement for interaction with infected CD4+ cells and induction of infectious virus from chronically infected CD8+ cells. *J. Immunol.* 1991 Abr 1;146(7):2220-2226.
93. Mercure L, Phaneuf D, Wainberg MA. Detection of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA in persistently infected CD8+ cells. *J. Gen. Virol.* 1993 Oct;74 (Pt 10):2077-2083.
94. Wang B, Dyer WB, Zaunders JJ, Mikhail M, Sullivan JS, Williams L, et al. Comprehensive analyses of a unique HIV-1-infected nonprogressor reveal a

- complex association of immunobiological mechanisms in the context of replication-incompetent infection. *Virology*. 2002 Dic 20;304(2):246-264.
95. McBreen S, Imlach S, Shirafuji T, Scott GR, Leen C, Bell JE, et al. Infection of the CD45RA+ (naive) subset of peripheral CD8+ lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J. Virol.* 2001 May;75(9):4091-4102.
 96. Brooks DG, Kitchen SG, Kitchen CM, Scripture-Adams DD, Zack JA. Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nat. Med.* 2001 Abr;7(4):459-464.
 97. Labrosse B, Labernardière J-L, Dam E, Trouplin V, Skrabal K, Clavel F, et al. Baseline susceptibility of primary human immunodeficiency virus type 1 to entry inhibitors. *J. Virol.* 2003 Ene;77(2):1610-1613.
 98. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* 2005 Dic;34(4):233-244.
 99. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science*. 2009 Mar 6;323(5919):1304-1307.
 100. Learmont J, Tindall B, Evans L, Cunningham A, Cunningham P, Wells J, et al. Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet*. 1992 Oct 10;340(8824):863-867.
 101. Sheppard HW, Lang W, Ascher MS, Vittinghoff E, Winkelstein W. The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *AIDS*. 1993 Sep;7(9):1159-1166.
 102. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS*. 1994 Ago;8(8):1123-1128.
 103. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 1995 Ene 26;332(4):201-208.
 104. Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Immunol.* 1995;13:487-512.
 105. Lefrère JJ, Morand-Joubert L, Mariotti M, Bludau H, Burghoffer B, Petit JC, et al. Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1997 Ago 1;90(3):1133-1140.
 106. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 1995 Ene 26;332(4):228-232.
 107. O'Brien TR, Blattner WA, Waters D, Eyster E, Hilgartner MW, Cohen AR, et al. Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study. *JAMA*. 1996 Jul 10;276(2):105-110.

108. Goudsmit J, Bogaards JA, Jurriaans S, Schuitemaker H, Lange JMA, Coutinho RA, et al. Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia. *AIDS*. 2002 Mar 29;16(5):791-793.
109. Rodés B, Toro C, Paxinos E, Poveda E, Martinez-Padial M, Benito JM, et al. Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *AIDS*. 2004 May 21;18(8):1109-1116.
110. Westrop SJ, Qazi NA, Pido-Lopez J, Nelson MR, Gazzard B, Gotch FM, et al. Transient nature of long-term nonprogression and broad virus-specific proliferative T-cell responses with sustained thymic output in HIV-1 controllers. *PLoS ONE*. 2009;4(5):e5474.
111. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin. Infect. Dis.* 2005 Oct 1;41(7):1053-1056.
112. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):406-416.
113. Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS*. 2009 Jun 1;23(9):1163-1169.
114. Walker BD. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med*. 2007 Sep;15(4):134-136.
115. Saksena NK, Rodes B, Wang B, Soriano V. Elite HIV controllers: myth or reality? *AIDS Rev*. 2007 Dic;9(4):195-207.
116. Tyler DS, Stanley SD, Nastala CA, Austin AA, Bartlett JA, Stine KC, et al. Alterations in antibody-dependent cellular cytotoxicity during the course of HIV-1 infection. Humoral and cellular defects. *J. Immunol*. 1990 May 1;144(9):3375-3384.
117. Collini P, Noursadeghi M, Sabroe I, Miller RF, Dockrell DH. Monocyte and macrophage dysfunction as a cause of HIV-1 induced dysfunction of innate immunity. *Curr. Mol. Med*. 2010 Nov;10(8):727-740.
118. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990 Dic 15;76(12):2421-2438.
119. Leibson PJ. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity*. 1997 Jun;6(6):655-661.
120. Bluman EM, Bartynski KJ, Avalos BR, Caligiuri MA. Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J. Clin. Invest*. 1996 Jun 15;97(12):2722-2727.
121. Sepúlveda C, Puente J, Weinstein C, Wolf ME, Mosnaim AD. Enhancement of natural killer cell activity in HIV-1-infected subjects by a mixture of the

- calcium ionophore A23187 and the phorbol ester TPA: lack of response to a similar challenge with interleukin-2 or alpha-interferon. *Am J Ther.* 1997 Dic;4(11-12):413-421.
122. Azzoni L, Papasavvas E, Chehimi J, Kostman JR, Mounzer K, Ondercin J, et al. Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity. *J. Immunol.* 2002 Jun 1;168(11):5764-5770.
123. Jacobs R, Heiken H, Schmidt RE. Mutual interference of HIV and natural killer cell-mediated immune response. *Mol. Immunol.* 2005 Feb;42(2):239-249.
124. Barker E, Martinson J, Brooks C, Landay A, Deeks S. Dysfunctional natural killer cells, in vivo, are governed by HIV viremia regardless of whether the infected individual is on antiretroviral therapy. *AIDS.* 2007 Nov 12;21(17):2363-2365.
125. Qi Y, Martin MP, Gao X, Jacobson L, Goedert JJ, Buchbinder S, et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog.* 2006 Ago;2(8):e79.
126. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat. Genet.* 2007 Jun;39(6):733-740.
127. Søndergaard SR, Aladdin H, Ullum H, Gerstoft J, Skinhøj P, Pedersen BK. Immune function and phenotype before and after highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 Ago 15;21(5):376-383.
128. Villanueva JL, Caballero J, Del Nozal M, Sanchez B, Viciana P, Alarcón A, et al. Peripheral blood natural killer cell reconstitution after highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 2000 Mar 10;14(4):473-474.
129. Weber K, Meyer D, Grosse V, Stoll M, Schmidt RE, Heiken H. Reconstitution of NK cell activity in HIV-1 infected individuals receiving antiretroviral therapy. *Immunobiology.* 2000 Ago;202(2):172-178.
130. Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, Lombardo G, Kottlil S, Planta MA, et al. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Dic 9;100(25):15011-15016.
131. Esser R, Glienke W, von Briesen H, Rübsamen-Waigmann H, Andreesen R. Differential regulation of proinflammatory and hematopoietic cytokines in human macrophages after infection with human immunodeficiency virus. *Blood.* 1996 Nov 1;88(9):3474-3481.
132. Mastroianni CM, Lichtner M, Mengoni F, D'Agostino C, Forcina G, d' Ettore G, et al. Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. *AIDS.* 1999 May 28;13(8):883-890.
133. Lekkerkerker AN, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission. *Curr. HIV Res.* 2006 Abr;4(2):169-176.

134. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:749-795.
135. DeVico AL, Gallo RC. Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004 May;2(5):401-413.
136. Alfano M, Poli G. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol. Immunol.* 2005 Feb;42(2):161-182.
137. Levy JA, Scott I, Mackewicz C. Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity. *Clin. Immunol.* 2003 Sep;108(3):167-174.
138. Servet C, Zitvogel L, Hosmalin A. Dendritic cells in innate immune responses against HIV. *Curr. Mol. Med.* 2002 Dic;2(8):739-756.
139. Chang TL, Klotman ME. Defensins: natural anti-HIV peptides. *AIDS Rev.* 2004 Sep;6(3):161-168.
140. Zhang L, Yu W, He T, Yu J, Caffrey RE, Dalmasso EA, et al. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science.* 2002 Nov 1;298(5595):995-1000.
141. Mackewicz CE, Yuan J, Tran P, Diaz L, Mack E, Selsted ME, et al. alpha-Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS.* 2003 Sep 26;17(14):F23-32.
142. Quiñones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, Chakraborty B, Weber J, Rangel HR, et al. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS.* 2003 Nov 7;17(16):F39-48.
143. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1985 Oct;76(4):1427-1435.
144. Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* 2002 Feb;14(1):96-102.
145. Furci L, Sironi F, Tolazzi M, Vassena L, Lusso P. Alpha-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. *Blood.* 2007 Abr 1;109(7):2928-2935.
146. Chang TL, Vargas J Jr, DelPortillo A, Klotman ME. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J. Clin. Invest.* 2005 Mar;115(3):765-773.
147. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 2002 Jun;23(6):291-296.
148. Rodríguez-García M, Climent N, Oliva H, Casanova V, Franco R, Leon A, et al. Increased alpha-defensins 1-3 production by dendritic cells in HIV-infected individuals is associated with slower disease progression. *PLoS ONE.* 2010;5(2):e9436.
149. Evans LA, Thomson-Honnebier G, Steimer K, Paoletti E, Perkus ME, Hollander H, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity is directed against

- both the gp120 and gp41 envelope proteins of HIV. *AIDS*. 1989 May;3(5):273-276.
150. Koup RA, Robinson JE, Nguyen QV, Pikora CA, Blais B, Roskey A, et al. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity directed by a human monoclonal antibody reactive with gp120 of HIV-1. *AIDS*. 1991 Nov;5(11):1309-1314.
 151. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Apr 1;100(7):4144-4149.
 152. Frost SDW, Wrin T, Smith DM, Kosakovsky Pond SL, Liu Y, Paxinos E, et al. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005 Dec 20;102(51):18514-18519.
 153. Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Zhou JY, Zhou JT, et al. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J. Infect. Dis.* 1997 Oct;176(4):924-932.
 154. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Simon MA, Lifton MA, Lin W, et al. Effect of humoral immune responses on controlling viremia during primary infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 2003 Feb;77(3):2165-2173.
 155. Kostrikis LG, Cao Y, Ngai H, Moore JP, Ho DD. Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F, and I: lack of direct correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum-dependent infectivity enhancement. *J. Virol.* 1996 Ene;70(1):445-458.
 156. Hengel RL, Kennedy MS, Steketee RW, Thea DM, Abrams EJ, Lambert G, et al. Neutralizing antibody and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1998 Apr 10;14(6):475-481.
 157. Montefiori DC, Hill TS, Vo HT, Walker BD, Rosenberg ES. Neutralizing antibodies associated with viremia control in a subset of individuals after treatment of acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 2001 Nov;75(21):10200-10207.
 158. Deeks SG, Schweighardt B, Wrin T, Galovich J, Hoh R, Sinclair E, et al. Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J. Virol.* 2006 Jun;80(12):6155-6164.
 159. Smith DM, Strain MC, Frost SDW, Pillai SK, Wong JK, Wrin T, et al. Lack of neutralizing antibody response to HIV-1 predisposes to superinfection. *Virology*. 2006 Nov 10;355(1):1-5.

160. Hogervorst E, Jurriaans S, de Wolf F, van Wijk A, Wiersma A, Valk M, et al. Predictors for non- and slow progression in human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection: low viral RNA copy numbers in serum and maintenance of high HIV-1 p24-specific but not V3-specific antibody levels. *J. Infect. Dis.* 1995 Abr;171(4):811-821.
161. Bailey JR, Sedaghat AR, Kieffer T, Brennan T, Lee PK, Wind-Rotolo M, et al. Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4+ T cells. *J. Virol.* 2006 Jul;80(13):6441-6457.
162. Ehl S, Klenerman P, Aichele P, Hengartner H, Zinkernagel RM. A functional and kinetic comparison of antiviral effector and memory cytotoxic T lymphocyte populations in vivo and in vitro. *Eur. J. Immunol.* 1997 Dic;27(12):3404-3413.
163. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 1999 Feb 5;283(5403):857-860.
164. Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, et al. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J. Exp. Med.* 1995 Abr 1;181(4):1365-1372.
165. Yang OO, Kalams SA, Trocha A, Cao H, Luster A, Johnson RP, et al. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J. Virol.* 1997 Abr;71(4):3120-3128.
166. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science.* 1986 Dic 19;234(4783):1563-1566.
167. Sacha JB, Chung C, Rakasz EG, Spencer SP, Jonas AK, Bean AT, et al. Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J. Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):2746-2754.
168. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature.* 2002 May 2;417(6884):95-98.
169. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 2004 Sep 20;200(6):761-770.
170. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature.* 2005 Abr 28;434(7037):1093-1097.
171. Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, Mui SK, Addo MM, Johnston MN, et al. Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection

- and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 2004 Sep 20;200(6):701-712.
172. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, et al. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J. Virol.* 2001 Dec;75(24):11983-11991.
 173. Kemball CC, Pack CD, Guay HM, Li Z-N, Steinhauer DA, Szomolanyi-Tsuda E, et al. The antiviral CD8+ T cell response is differentially dependent on CD4+ T cell help over the course of persistent infection. *J. Immunol.* 2007 Jul 15;179(2):1113-1121.
 174. Iyasere C, Tilton JC, Johnson AJ, Younes S, Yassine-Diab B, Sekaly R-P, et al. Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *J. Virol.* 2003 Oct;77(20):10900-10909.
 175. Younes S-A, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel M-R, Grossman Z, Routy J-P, et al. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J. Exp. Med.* 2003 Dec 15;198(12):1909-1922.
 176. Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood.* 2004 Feb 1;103(3):966-972.
 177. Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J. Immunol.* 2005 Ene 15;174(2):1037-1045.
 178. Plana M, Garcia F, Gallart T, Miró JM, Gatell JM. Lack of T-cell proliferative response to HIV-1 antigens after 1 year of highly active antiretroviral treatment in early HIV-1 disease. Immunology Study Group of Spanish EARTH-1 Study. *Lancet.* 1998 Oct 10;352(9135):1194-1195.
 179. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med.* 1999 Mar 15;189(6):991-998.
 180. Bagasra O, Pomerantz RJ. The role of CD8-positive lymphocytes in the control of HIV-1 infection of peripheral blood mononuclear cells. *Immunol. Lett.* 1993 Feb;35(2):83-92.
 181. Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, et al. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature.* 1991 Dic 12;354(6353):453-459.
 182. Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Pfeffer N, Meyers H, et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* 1997 Feb;3(2):205-211.

183. Price DA, Goulder PJ, Kleenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, et al. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997 Mar 4;94(5):1890-1895.
184. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol.* 2002 Nov;3(11):1061-1068.
185. Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C, Vallelian F, Bart P-A, Pantaleo G. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005 May 17;102(20):7239-7244.
186. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood.* 2006 Jun 15;107(12):4781-4789.
187. Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, Young DH, Morris MM, Garcia JC, et al. Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood.* 2009 Abr 23;113(17):3978-3989.
188. Kaul R, Rebbapragada A, Hirbod T, Wachihi C, Ball TB, Plummer FA, et al. Genital levels of soluble immune factors with anti-HIV activity may correlate with increased HIV susceptibility. *AIDS.* 2008 Oct 1;22(15):2049-2051.
189. Restrepo C, Rallón NI, del Romero J, Rodríguez C, Hernando V, López M, et al. Low-level exposure to HIV induces virus-specific T cell responses and immune activation in exposed HIV-seronegative individuals. *J. Immunol.* 2010 Jul 15;185(2):982-989.
190. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature.* 2001 Abr 19;410(6831):980-987.
191. Hadida F, Vieillard V, Mollet L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Debré P. Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 1999 Ago 1;163(3):1105-1109.
192. Walker CM, Erickson AL, Hsueh FC, Levy JA. Inhibition of human immunodeficiency virus replication in acutely infected CD4+ cells by CD8+ cells involves a noncytotoxic mechanism. *J. Virol.* 1991 Nov;65(11):5921-5927.
193. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 1995 Dic 15;270(5243):1811-1815.
194. Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol. Today.* 1996 May;17(5):217-224.
195. Slifka MK, Rodriguez F, Whitton JL. Rapid on/off cycling of cytokine production by virus-specific CD8+ T cells. *Nature.* 1999 Sep 2;401(6748):76-79.

196. McManus CM, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine induction of MIP-1 alpha and MIP-1 beta in human fetal microglia. *J. Immunol.* 1998 Feb 1;160(3):1449-1455.
197. Lane BR, Markovitz DM, Woodford NL, Rochford R, Strieter RM, Coffey MJ. TNF-alpha inhibits HIV-1 replication in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages by inducing the production of RANTES and decreasing C-C chemokine receptor 5 (CCR5) expression. *J. Immunol.* 1999 Oct 1;163(7):3653-3661.
198. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2002 Oct;2(10):735-747.
199. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol. Today.* 1995 Apr;16(4):194-201.
200. Hayes MP, Berrebi GA, Henkart PA. Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A. *J. Exp. Med.* 1989 Sep 1;170(3):933-946.
201. Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr. Opin. Immunol.* 2007 Jun;19(3):339-347.
202. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, et al. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J. Biol. Chem.* 2001 Nov 16;276(46):43285-43293.
203. Zhang D, Pasternack MS, Beresford PJ, Wagner L, Greenberg AH, Lieberman J. Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J. Biol. Chem.* 2001 Feb 2;276(5):3683-3690.
204. Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science.* 1998 Nov 27;282(5394):1714-1717.
205. Kojima H, Shinohara N, Hanaoka S, Someya-Shirota Y, Takagaki Y, Ohno H, et al. Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 1994 Ago;1(5):357-364.
206. Sun M, Lee S, Karray S, Levi-Strauss M, Ames KT, Fink PJ. Cutting edge: two distinct motifs within the Fas ligand tail regulate Fas ligand-mediated costimulation. *J. Immunol.* 2007 Nov 1;179(9):5639-5643.
207. Walker CM, Levy JA. A diffusible lymphokine produced by CD8+ T lymphocytes suppresses HIV replication. *Immunology.* 1989 Apr;66(4):628-630.
208. Brinchmann JE, Gaudernack G, Vartdal F. CD8+ T cells inhibit HIV replication in naturally infected CD4+ T cells. Evidence for a soluble inhibitor. *J. Immunol.* 1990 Apr 15;144(8):2961-2966.
209. Rubbert A, Weissman D, Combadiere C, Pettrone KA, Daucher JA, Murphy PM, et al. Multifactorial nature of noncytolytic CD8+ T cell-mediated

- suppression of HIV replication: beta-chemokine-dependent and -independent effects. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1997 Ene 1;13(1):63-69.
210. Chang TL-Y, François F, Mosoian A, Klotman ME. CAF-mediated human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transcriptional inhibition is distinct from alpha-defensin-1 HIV inhibition. *J. Virol*. 2003 Jun;77(12):6777-6784.
 211. Tsubota H, Lord CI, Watkins DI, Morimoto C, Letvin NL. A cytotoxic T lymphocyte inhibits acquired immunodeficiency syndrome virus replication in peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med*. 1989 Abr 1;169(4):1421-1434.
 212. Walker CM, Thomson-Honnebier GA, Hsueh FC, Erickson AL, Pan LZ, Levy JA. CD8+ T cells from HIV-1-infected individuals inhibit acute infection by human and primate immunodeficiency viruses. *Cell. Immunol*. 1991 Oct 15;137(2):420-428.
 213. Blackbourn DJ, Locher CP, Ramachandran B, Barnett SW, Murthy KK, Carey KD, et al. CD8+ cells from HIV-2-infected baboons control HIV replication. *AIDS*. 1997 May;11(6):737-746.
 214. Chen CH, Weinhold KJ, Bartlett JA, Bolognesi DP, Greenberg ML. CD8+ T lymphocyte-mediated inhibition of HIV-1 long terminal repeat transcription: a novel antiviral mechanism. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1993 Nov;9(11):1079-1086.
 215. Copeland KF, McKay PJ, Rosenthal KL. Suppression of activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is not lentivirus specific. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1995 Nov;11(11):1321-1326.
 216. Stranford SA, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang SY, Sninsky J, et al. Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8(+) cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 Feb 2;96(3):1030-1035.
 217. Mackewicz CE, Ortega HW, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J. Clin. Invest*. 1991 Abr;87(4):1462-1466.
 218. Cocchi F, DeVico AL, Yarchoan R, Redfield R, Cleghorn F, Blattner WA, et al. Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels from CD8+ T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 Dic 5;97(25):13812-13817.
 219. Gonzalez E, Dhanda R, Bamshad M, Mummidi S, Geevarghese R, Catano G, et al. Global survey of genetic variation in CCR5, RANTES, and MIP-1alpha: impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Abr 24;98(9):5199-5204.
 220. Guan Y, Abdelwahab S, Kamin-Lewis R, DeVico AL, Lewis GK. Self-protection of individual CD4+ T cells against R5 HIV-1 infection by the synthesis of anti-viral CCR5 ligands. *PLoS ONE*. 2008;3(10):e3481.

221. Moriggl R, Sexl V, Piekorz R, Topham D, Ihle JN. Stat5 activation is uniquely associated with cytokine signaling in peripheral T cells. *Immunity*. 1999 Ago;11(2):225-230.
222. Martino A, Holmes JH 4th, Lord JD, Moon JJ, Nelson BH. Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J. Immunol*. 2001 Feb 1;166(3):1723-1729.
223. Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*. 2004 Nov 7;28(3):109-123.
224. Gil MP, Bohn E, O'Guin AK, Ramana CV, Levine B, Stark GR, et al. Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Jun 5;98(12):6680-6685.
225. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:749-795.
226. Zimmerman C, Brduscha-Riem K, Blaser C, Zinkernagel RM, Pircher H. Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. *J. Exp. Med.* 1996 Abr 1;183(4):1367-1375.
227. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J. Virol.* 2004 Jun;78(11):5535-5545.
228. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 1997 Nov 3;186(9):1407-1418.
229. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999 Oct 14;401(6754):708-712.
230. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GMA, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* 2002 Abr;8(4):379-385.
231. Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):393-405.
232. Shin H, Wherry EJ. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr. Opin. Immunol.* 2007 Ago;19(4):408-415.
233. Appay V. HIV-specific CD8+ T Cells Produce Antiviral Cytokines but Are Impaired in Cytolytic Function. *Journal of Experimental Medicine*. 2000 Jul;192(1):63-76.
234. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008 Nov;73(11):975-983.
235. Trimble LA, Lieberman J. Circulating CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and downmodulate CD3 zeta, the signaling chain of the T-cell receptor complex. *Blood*. 1998 Ene 15;91(2):585-594.

236. Trimble LA, Kam LW, Friedman RS, Xu Z, Lieberman J. CD3zeta and CD28 down-modulation on CD8 T cells during viral infection. *Blood*. 2000 Ago 1;96(3):1021-1029.
237. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992 Nov;11(11):3887-3895.
238. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006 Sep 21;443(7109):350-354.
239. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med*. 2006 Oct;12(10):1198-1202.
240. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J. Exp. Med*. 2006 Oct 2;203(10):2281-2292.
241. Zhang J-Y, Zhang Z, Wang X, Fu J-L, Yao J, Jiao Y, et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):4671-4678.
242. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 2008 Dic 19;29(6):1009-1021.
243. Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, Kaminski M, et al. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology*. 2008 Jun;134(7):1927-1937, 1937.e1-2.
244. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*. 2003 Abr 1;101(7):2711-2720.
245. Hathcock KS, Kaech SM, Ahmed R, Hodes RJ. Induction of telomerase activity and maintenance of telomere length in virus-specific effector and memory CD8+ T cells. *J. Immunol*. 2003 Ene 1;170(1):147-152.
246. Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Peña J, et al. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech. Ageing Dev*. 2000 Dic 20;121(1-3):77-88.
247. Hoji A, Connolly NC, Buchanan WG, Rinaldo CR Jr. CD27 and CD57 expression reveals atypical differentiation of human immunodeficiency virus type 1-specific memory CD8+ T cells. *Clin. Vaccine Immunol*. 2007 Ene;14(1):74-80.

248. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 1998 Dic 21;188(12):2205-2213.
249. Kalams SA, Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 1998 Dic 21;188(12):2199-2204.
250. Bradley LM, Haynes L, Swain SL. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol.* 2005 Mar;26(3):172-176.
251. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature.* 1998 Jun 4;393(6684):480-483.
252. Mueller YM, De Rosa SC, Hutton JA, Witek J, Roederer M, Altman JD, et al. Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8(+) T cells. *Immunity.* 2001 Dic;15(6):871-882.
253. Topp MS, Riddell SR, Akatsuka Y, Jensen MC, Blattman JN, Greenberg PD. Restoration of CD28 expression in CD28- CD8+ memory effector T cells reconstitutes antigen-induced IL-2 production. *J. Exp. Med.* 2003 Sep 15;198(6):947-955.
254. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003 Abr;4(4):330-336.
255. Kanwar B, Favre D, McCune JM. Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS.* 2010 Mar;5(2):151-157.
256. Lim A, Tan D, Price P, Kamarulzaman A, Tan H-Y, James I, et al. Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy. *AIDS.* 2007 Jul 31;21(12):1525-1534.
257. Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, Higasa S, Kakishita E, Shirasaka T, et al. Relationship of CD4+CD25+ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. *AIDS.* 2005 Jun 10;19(9):879-886.
258. Brandt L, Benfield T, Mens H, Clausen LN, Katzenstein TL, Fomsgaard A, et al. Low level of regulatory T-cells and maintenance of balance between regulatory T-cells and TH17 cells in HIV-1-infected Elite Controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr [Internet].* 2011 Mar 9 [citado 2011 May 25];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407087>
259. Sáez-Cirión A, Lacabartz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 Abr 17;104(16):6776-6781.
260. Hersperger AR, Pereyra F, Nason M, Demers K, Sheth P, Shin LY, et al. Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog.* 2010 May;6(5):e1000917.

261. Alexander L, Aquino-DeJesus MJ, Chan M, Andiman WA. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a two-amino-acid insertion in HIV-1 Vif from a nonprogressing mother and child. *J. Virol.* 2002 Oct;76(20):10533-10539.
262. Calugi G, Montella F, Favalli C, Benedetto A. Entire genome of a strain of human immunodeficiency virus type 1 with a deletion of nef that was recovered 20 years after primary infection: large pool of proviruses with deletions of env. *J. Virol.* 2006 Dic;80(23):11892-11896.
263. Wang B, Mikhail M, Dyer WB, Zaunders JJ, Kelleher AD, Saksena NK. First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection. *Virology.* 2003 Jul 20;312(1):135-150.
264. Migueles SA, Laborico AC, Imamichi H, Shupert WL, Royce C, McLaughlin M, et al. The differential ability of HLA B*5701+ long-term nonprogressors and progressors to restrict human immunodeficiency virus replication is not caused by loss of recognition of autologous viral gag sequences. *J. Virol.* 2003 Jun;77(12):6889-6898.
265. Lamine A, Caumont-Sarcos A, Chaix M-L, Saez-Cirion A, Rouzioux C, Delfraissy J-F, et al. Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *AIDS.* 2007 May 11;21(8):1043-1045.
266. Blankson JN, Bailey JR, Thayil S, Yang H-C, Lassen K, Lai J, et al. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J. Virol.* 2007 Mar;81(5):2508-2518.
267. Rachinger A, Navis M, van Assen S, Groeneveld PHP, Schuitemaker H. Recovery of viremic control after superinfection with pathogenic HIV type 1 in a long-term elite controller of HIV type 1 infection. *Clin. Infect. Dis.* 2008 Dic 1;47(11):e86-89.
268. Bailey JR, O'Connell K, Yang H-C, Han Y, Xu J, Jilek B, et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a patient who developed AIDS to an elite suppressor. *J. Virol.* 2008 Ago;82(15):7395-7410.
269. Qi Y, Martin MP, Gao X, Jacobson L, Goedert JJ, Buchbinder S, et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog.* 2006 Ago;2(8):e79.
270. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat. Genet.* 2007 Jun;39(6):733-740.
271. Loré K, Sönnernborg A, Broström C, Goh L-E, Perrin L, McDade H, et al. Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS.* 2002 Mar 29;16(5):683-692.
272. Soumelis V, Scott I, Gheys F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L, et al. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood.* 2001 Ago 15;98(4):906-912.

273. Alfano M, Poli G. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol. Immunol.* 2005 Feb;42(2):161-182.
274. Levy JA, Scott I, Mackewicz C. Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity. *Clin. Immunol.* 2003 Sep;108(3):167-174.
275. Servedi C, Zitzvogel L, Hosmalin A. Dendritic cells in innate immune responses against HIV. *Curr. Mol. Med.* 2002 Dic;2(8):739-756.
276. Stewart GJ, Ashton LJ, Biti RA, French RA, Bennetts BH, Newcombe NR, et al. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS.* 1997 Dic;11(15):1833-1838.
277. Salgado M, Simón A, Sanz-Minguela B, Rallón NI, López M, Vicario JL, et al. An additive effect of protective host genetic factors correlates with HIV nonprogression status. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2011 Abr;56(4):300-305.
278. Dolan MJ, Kulkarni H, Camargo JF, He W, Smith A, Anaya J-M, et al. CCL3L1 and CCR5 influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms. *Nat. Immunol.* 2007 Dic;8(12):1324-1336.
279. Lambotte O, Ferrari G, Moog C, Yates NL, Liao H-X, Parks RJ, et al. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS.* 2009 May 15;23(8):897-906.
280. Klein MR, van der Burg SH, Hovenkamp E, Holwerda AM, Drijfhout JW, Melief CJ, et al. Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Gen. Virol.* 1998 Sep;79 (Pt 9):2191-2201.
281. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, et al. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 Mar 14;97(6):2709-2714.
282. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M, et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science.* 2007 Ago 17;317(5840):944-947.
283. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, et al. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.* 2007 Ene;13(1):46-53.
284. Catano G, Kulkarni H, He W, Marconi VC, Agan BK, Landrum M, et al. HIV-1 disease-influencing effects associated with ZNRD1, HCP5 and HLA-C alleles are attributable mainly to either HLA-A10 or HLA-B*57 alleles. *PLoS ONE.* 2008;3(11):e3636.
285. Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, Martin JN, et al. HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J. Virol.* 2008 Jun;82(11):5398-5407.

286. López M, Rallón N, Soriano V, Rodríguez I, Valencia E, Labarga P, et al. HIV rebound after discontinuation of antiretroviral therapy increases and expands HIV-specific CD8+ responses but has no impact on its functionality. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2008 Sep;24(9):1197-1201.
287. Emu B, Sinclair E, Favre D, Moretto WJ, Hsue P, Hoh R, et al. Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J. Virol*. 2005 Nov;79(22):14169-14178.
288. Migueles SA, Weeks KA, Nou E, Berkley AM, Rood JE, Osborne CM, et al. Defective human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell polyfunctionality, proliferation, and cytotoxicity are not restored by antiretroviral therapy. *J. Virol*. 2009 Nov;83(22):11876-11889.
289. Pontesilli O, Carotenuto P, Kerkhof-Garde SR, Roos MT, Keet IP, Coutinho RA, et al. Lymphoproliferative response to HIV type 1 p24 in long-term survivors of HIV type 1 infection is predictive of persistent AIDS-free infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1999 Jul 20;15(11):973-981.
290. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997 Nov 21;278(5342):1447-1450.
291. Martinez V, Costagliola D, Bonduelle O, N'go N, Schnuriger A, Théodorou I, et al. Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *J. Infect. Dis*. 2005 Jun 15;191(12):2053-2063.
292. Dyer WB, Zaunders JJ, Yuan FF, Wang B, Learmont JC, Geczy AF, et al. Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection. *Retrovirology*. 2008;5:112.
293. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A, et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis*. 2008 Feb 15;197(4):563-571.
294. Zaunders JJ, Ip S, Munier ML, Kaufmann DE, Suzuki K, Brereton C, et al. Infection of CD127+ (interleukin-7 receptor+) CD4+ cells and overexpression of CTLA-4 are linked to loss of antigen-specific CD4 T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol*. 2006 Oct;80(20):10162-10172.
295. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat. Immunol*. 2007 Nov;8(11):1246-1254.
296. Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, Feeney M, et al. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med*. 2004 Mar;10(3):282-289.

297. Friedrich TC, Dodds EJ, Yant LJ, Vojnov L, Rudersdorf R, Cullen C, et al. Reversion of CTL escape-variant immunodeficiency viruses in vivo. *Nat. Med.* 2004 Mar;10(3):275-281.
298. Miura T, Brockman MA, Schneidewind A, Lobritz M, Pereyra F, Rathod A, et al. HLA-B57/B*5801 human immunodeficiency virus type 1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong cytotoxic T-lymphocyte [corrected] recognition. *J. Virol.* 2009 Mar;83(6):2743-2755.
299. Goepfert PA, Lumm W, Farmer P, Matthews P, Prendergast A, Carlson JM, et al. Transmission of HIV-1 Gag immune escape mutations is associated with reduced viral load in linked recipients. *J. Exp. Med.* 2008 May 12;205(5):1009-1017.
300. Goulder PJR, Watkins DI. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat. Rev. Immunol.* 2008 Ago;8(8):619-630.
301. Bangham CRM. CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur. J. Immunol.* 2009 Jul;39(7):1700-1712.
302. Gea-Banacloche JC, Migueles SA, Martino L, Shupert WL, McNeil AC, Sabbaghian MS, et al. Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J. Immunol.* 2000 Jul 15;165(2):1082-1092.
303. Edwards BH, Bansal A, Sabbaj S, Bakari J, Mulligan MJ, Goepfert PA. Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J. Virol.* 2002 Mar;76(5):2298-2305.
304. Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, et al. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J. Virol.* 2003 Feb;77(3):2081-2092.
305. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J. Exp. Med.* 2007 Oct 1;204(10):2473-2485.
306. Daucher M, Price DA, Brenchley JM, Lamoreaux L, Metcalf JA, Rehm C, et al. Virological outcome after structured interruption of antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection is associated with the functional profile of virus-specific CD8+ T cells. *J. Virol.* 2008 Abr;82(8):4102-4114.
307. Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, Jaye A, McMichael AJ, Whittle HC, et al. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur. J. Immunol.* 2008 Feb;38(2):350-363.
308. Turk G, Gherardi MM, Laufer N, Saracco M, Luzzi R, Cox JH, et al. Magnitude, breadth, and functional profile of T-cell responses during human

- immunodeficiency virus primary infection with B and BF viral variants. *J. Virol.* 2008 Mar;82(6):2853-2866.
309. Critchfield JW, Young DH, Hayes TL, Braun JV, Garcia JC, Pollard RB, et al. Magnitude and complexity of rectal mucosa HIV-1-specific CD8+ T-cell responses during chronic infection reflect clinical status. *PLoS ONE.* 2008;3(10):e3577.
 310. López M, Soriano V, Rallón N, Cascajero A, González-Lahoz J, Benito JM. Suppression of viral replication with highly active antiretroviral therapy has no impact on the functional profile of HIV-specific CD8(+) T cells. *Eur. J. Immunol.* 2008 Jun;38(6):1548-1558.
 311. Rehr M, Cahenzli J, Haas A, Price DA, Gostick E, Huber M, et al. Emergence of polyfunctional CD8+ T cells after prolonged suppression of human immunodeficiency virus replication by antiretroviral therapy. *J. Virol.* 2008 Abr;82(7):3391-3404.
 312. Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat. Med.* 2004 Ago;10(8):806-810.
 313. Callan MFC. The evolution of antigen-specific CD8+ T cell responses after natural primary infection of humans with Epstein-Barr virus. *Viral Immunol.* 2003;16(1):3-16.
 314. Bertoletti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology.* 2003 Jul;38(1):4-13.
 315. Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, Young DH, Morris MM, Garcia JC, et al. Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood.* 2009 Abr 23;113(17):3978-3989.
 316. Sekaly R-P. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J. Exp. Med.* 2008 Ene 21;205(1):7-12.
 317. Streeck H, Brumme ZL, Anastario M, Cohen KW, Jolin JS, Meier A, et al. Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells. *PLoS Med.* 2008 May 6;5(5):e100.
 318. Carmichael A, Jin X, Sissons P, Borysiewicz L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J. Exp. Med.* 1993 Feb 1;177(2):249-256.
 319. Ndongala ML, Peretz Y, Boulet S, Doroudchi M, Yassine-Diab B, Boulassel M-R, et al. HIV Gag p24 specific responses secreting IFN-gamma and/or IL-2 in treatment-naïve individuals in acute infection early disease (AIED) are associated with low viral load. *Clin. Immunol.* 2009 May;131(2):277-287.
 320. Kristensen NN, Christensen JP, Thomsen AR. High numbers of IL-2-producing CD8+ T cells during viral infection: correlation with stable memory development. *J. Gen. Virol.* 2002 Sep;83(Pt 9):2123-2133.

321. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* 2003 Abr;77(8):4911-4927.
322. López M, Soriano V, Benito JM. Escape mutations in HIV infection and its impact on CD8+ T cell responses. *Curr. Mol. Med.* 2007 Ago;7(5):446-458.
323. Sester M, Sester U, Köhler H, Schneider T, Deml L, Wagner R, et al. Rapid whole blood analysis of virus-specific CD4 and CD8 T cell responses in persistent HIV infection. *AIDS.* 2000 Dic 1;14(17):2653-2660.
324. Shankar P, Russo M, Harnisch B, Patterson M, Skolnik P, Lieberman J. Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood.* 2000 Nov 1;96(9):3094-3101.
325. Day CL, Kiepiela P, Leslie AJ, van der Stok M, Nair K, Ismail N, et al. Proliferative capacity of epitope-specific CD8 T-cell responses is inversely related to viral load in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 2007 Ene;81(1):434-438.
326. Casazza JP, Betts MR, Picker LJ, Koup RA. Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood after initiation of highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 2001 Jul;75(14):6508-6516.
327. Tsalimalma K, Kordossis T, Choremi-Papadopoulou E. Antiretroviral therapy-induced dominant interleukin-2 HIV-1 Gag CD4+ T cell response: evidence of functional recovery of HIV-1-specific CD4+ T cells. *Scand. J. Immunol.* 2011 Mar;73(3):256-265.
328. Davey RT Jr, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 Dic 21;96(26):15109-15114.
329. Ortiz GM, Wellons M, Brancato J, Vo HT, Zinn RL, Clarkson DE, et al. Structured antiretroviral treatment interruptions in chronically HIV-1-infected subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Nov 6;98(23):13288-13293.
330. Lécuroux C, Girault I, Boutboul F, Urrutia A, Goujard C, Meyer L, et al. Antiretroviral therapy initiation during primary HIV infection enhances both CD127 expression and the proliferative capacity of HIV-specific CD8+ T cells. *AIDS.* 2009 Ago 24;23(13):1649-1658.
331. Cellerai C, Harari A, Stauss H, Yerly S, Geretti A-M, Carroll A, et al. Early and prolonged antiretroviral therapy is associated with an HIV-1-specific T-cell profile comparable to that of long-term non-progressors. *PLoS ONE.* 2011;6(4):e18164.

PUBLICACIONES SURGIDAS

Peris-Pertusa A, López M, Rallón NI, Restrepo C, Soriano V, Benito JM. Evolution of the functional profile of HIV-specific CD8+ T cells in patients with different progression of HIV infection over 4 years. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010 Sep;55(1):29-38.

López M, Soriano V, **Peris-Pertusa A**, Rallón N, Restrepo C, Benito JM. Elite controllers display higher activation on central memory CD8 T cells than HIV patients successfully on HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Feb;27(2):157-65.

Restrepo C, Rallón NI, del Romero J, Hernando V, López M, **Peris A** et al. Low-level exposure to HIV induces virus-specific T cell responses and immune activation in exposed HIV-seronegative individuals. *J Immunol*. 2010 Jul;185(2):982-9.

López M, **Peris A**, Soriano V, Lozano S, Vicario JL, Rallón NI et al. The expansion ability but not the quality of HIV-specific CD8+ T cells is associated with protective human leucocyte antigen class I alleles in long-term non-progressors. *Immunology*. 2011 Nov;134(3):305-13.

Rallón N, Soriano V, Restrepo C, Labarga P, López M, **Peris A** et al. HCV-specific T cell responses in HIV/HCV coinfecting patients on HAART are comparable to those observed in HCV-monoinfected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011 May;57(1):1-8.

López M, Vispo E, Román JS, Herrero D, **Peris A**, Corral A et al. High Risk of Endothelial Dysfunction in HIV Individuals May Result from Deregulation of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Sep (*en prensa*).

ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo Monoclonal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNbc	Ácido desoxirribonucleico bicatenario
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G</i> (Enzima editora del ARNm de la Apolipoproteína B que induce el cambio de G por A)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNmc	Ácido ribonucleico monocatenario
bDNA	<i>branched DNA</i> (Ensayo de ADN ramificado)
CAF	<i>Cellular AntiHIV Factor</i> (Factor anti-VIH celular)
CASPASAS	<i>Cysteine Aspartate-specific Proteases</i> (Proteasas específicas de cisteinil-aspartato)
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i> (Ligando de quimiocina con motivo C-C)
CCR	<i>Chemokine (C-C motif) Receptor</i> (Receptor de quimiocinas con motivo C-C)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de diferenciación)
CE	Controlador de Élite
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
CMV	Citomegalovirus
CRF	<i>Circulating Recombinants Forms</i> (Formas recombinantes circulantes)
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> (Linfocito T CD8+ citotóxico)
CTLA	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein</i> (Proteína asociada a CTL)
CV	Controladores virémicos
CXCR	<i>Chemokine (C-X-C motif) Receptor</i> (Receptor de quimiocinas con motivo C-X-C)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECD	<i>Phycoerythrin-Texas Rex®-X</i> (Ficoeritrina-Rojo de Texas®-X)

EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido tetraacético de etilenodiamina)
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> (Proteína con dominio de muerte asociado a Fas)
Fas	Factor asociado a apoptosis
FasL	Ligando de Fas
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (Fluoresceína Isotiocianato)
FoxP	<i>Forkhead Box Protein</i> (Proteína de la familia <i>Forkhead</i>)
GALT	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i> (Tejido linfático asociado a las mucosas del tracto gastrointestinal)
gp	Glicoproteína
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno leucocitario humano)
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i> (Molécula de adhesión intracelular)
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IN	Integrasa
Jak/STAT	Janus tyrosine kinases/Signal Transducers and Activators of Transcription (Tirosín quinasas de Janus/Transductores de señal y activadores de transcripción)
LCMV	<i>Lymphocytic Choriomeningitis Virus</i> (Virus de la coriomeningitis linfocítica)
LTNP	<i>Long Term Non-progressor</i> (No progresor a largo plazo)
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i> (Secuencias terminales largas repetidas)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo mayor de histocompatibilidad)
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i> (Proteína inflamatoria de macrófagos)
NK	<i>Natural Killer</i> (Células “asesinas naturales o innatas”)

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampón fosfato salino)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PECY7	<i>PE-Cyanine dye 7</i> (Ficoeritrina cianina 7)
PD	<i>Programmed death</i> (Receptor de muerte programada)
PIT	Progresores con Interrupción del Tratamiento antirretroviral
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> (Forbol 12-miristato 13-acetato)
PR	Proteasa
PT	Progresores Típicos
PTARV	Pacientes en Tratamiento Antirretroviral
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted</i> (Regulador expresado y secretado en la activación por la célula T)
R10	Medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SBF, 2% L-glutamina, 1% Penicilina/estreptomicina y 0,1% gentamicina
SBF	Suero Bovino Fetal
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i> (Virus de la Inmunodeficiencia en el Simio)
TAP	<i>Transcytosis-Associated Protein</i> (Proteínas Asociadas a la Transcitosis)
TARV	Tratamiento Antirretroviral
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (Receptor de células T)
TI	Transcriptasa inversa
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Factor de Necrosis Tumoral)
TNFR	<i>TNF Receptor</i> (Receptor del TNF)
Treg	Células T reguladoras
VEB	Virus de Epstein-Barr
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1